

---

# Humane Topoisomerase I und genotoxischer Stress

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium**  
**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
im November 2006

von Diplom-Biochemikerin Anja Rockstroh  
geboren am 09. Juli 1978 in Sonneberg

---

---

Gutachter:

Prof. Frank Große

Friedrich-Schiller-Universität Jena /  
Fritz-Lipmann-Institut Jena e.V.

Prof. Frank-Dietmar Böhmer

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Bernd Epe

Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Rigorosum:

abgelegt am 29.01.2007 in Jena

Verteidigung:

05.02.2007 in Jena

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

---

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Topoisomerasen	1
1.2. Die humane Topoisomerase I als Vertreter der Typ IB Topoisomerasen	2
1.3. Die duale Natur der Topoisomerasen	6
1.4. Die hTopoI-Schadensantwort	8
1.5. Die Regulation der hTopoI bzw. hTopoI-Schadensantwort durch posttranslationale Modifikation	11
1.6. Die Regulation der hTopoI bzw. hTopoI-Schadensantwort durch Protein-Protein-Interaktionen	13
1.7. Die zelluläre Schadensantwort	16
1.8. Der programmierte Zelltod / Apoptose	20
<b>2. Zielstellung</b>	<b>24</b>
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	25
3.2. Verwendete Zelllinien	25
3.3. Behandlung der Zellen	26
3.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	26
3.6. Western-Blot	27
3.7. Verwendete Antikörper	28
3.8. ICT Assay	28
3.9. Agarose-Gelelektrophorese	29
3.10. Durchflusszytometrie	29
3.11. Dead Cell Removal Kit	30
3.12. alamarBlue™-Assay	30
3.13. Stabile Transfektion	31
3.14. Chemikalien / Verbrauchsmaterialien	31
3.15. Geräte	32
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1. Induktion einer hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit UVC-Strahlung	33
4.2. hTopoI-Schnittkomplexe korrelieren mit apoptotisch fragmentierter DNA	36
4.3. Kinetik der hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Induktion oxidativer DNA-Schäden	37
4.4. Induktion einer hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit Colcemid	39
4.5. Quantifizierung der induzierten hTopoI-Schnittkomplexe in apoptotischen Zellen	42
4.6. hTopoI-Schadensantwort nach Apoptoseinduktion mit TNF $\alpha$	43
4.7. Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen	43
4.8. Einfluss apoptotisch bedingter DNA-Strangbrüche auf die hTopoI-Schnittkomplexbildung	45
4.9. hTopoI-Schadensantwort in einer Zelllinie mit defekter Basenexzisionsreparatur	47
4.10. Induktion einer hTopoI-Schadensantwort nach Hypoxie / Reoxygenierung	49
<b>5. Diskussion</b>	<b>51</b>
5.1. Wie entstehen stabilisierte hTopoI-Schnittkomplexe <i>in vivo</i> ?	51
5.2. Welche Funktion haben hTopoI-Schnittkomplexe in der Zelle?	61
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>

---

## 1. Einleitung

Obgleich die genetische Information eines Organismus primär durch die Sequenz der DNA-Basen festgelegt wird, spielen bei der Umsetzung dieser Information auch Modifikationen sowie die Topologie der DNA eine entscheidende Rolle. Enzyme, welche die Topologie der zellulären DNA regulieren und beeinflussen können, werden in der Klasse der Topoisomerasen zusammengefasst. Diese ubiquitär vorkommenden Proteine werden im Zuge der Replikation, Transkription und Rekombination benötigt, spielen aber auch eine Rolle bei der Chromosomenkondensation und -Segregation. Darüber hinaus hat sich das Interesse an der Untersuchung der Topoisomerasen in den vergangenen Jahrzehnten auch auf die klinische Forschung ausgeweitet. Die Topoisomerase I konnte als ein prominentes Autoantigen in rheumatischen Erkrankungen, wie der systemischen Sklerodermie, identifiziert werden ([Überblick bei Maul et al., 1986; Shero et al., 1986](#)). Des Weiteren gehören die Topoisomerasen zu den primären zellulären Zielen einiger der am weitesten verbreiteten Antibiotika und Chemotherapeutika, die in der Klinik eingesetzt werden. Der Mechanismus, durch den Topoisomerasen nach Einwirkung von Medikamenten zu zellulären Toxinen umfunktioniert werden, scheint auch unter physiologischen Bedingungen in der Zelle eine Rolle zu spielen. Die genauere Charakterisierung, sowie die Untersuchung der Regulation und Bedeutung dieser relativ neu entdeckten Funktion der humanen Topoisomerase I, sollte Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

### 1.1. Topoisomerasen

Für viele Prozesse des DNA-Metabolismus müssen die Stränge der Duplex-DNA vorübergehend (z.B. Transkription, Rekombination) oder permanent (Replikation) voneinander getrennt werden. Durch den doppelhelikalen Charakter der DNA entsteht dabei torsionaler Stress ([Liu and Wang, 1987; Pruss and Drlica, 1986; Wang, 1971; Wu et al., 1988](#)). Im Zuge der DNA-Replikation muss die DNA etwa alle 10 – 20 Basenpaare geschnitten werden, um die entstehende Superspiralisierung zu entfernen ([Hardy et al., 2004](#)). Auch die Umwindung der Histonkomplexe und die Assoziation der DNA mit Proteinen im Allgemeinen, führen zur Induzierung

Enzym	Typ	Zelluläre Funktion
Topoisomerase I	IB	Replikation, Transkription, Chromatin Modellierung
mt Topoisomerase I	IB	Mitochondrielle Replikation, Transkription
Topoisomerase II $\alpha, \beta$	IIA	Replikation, Chromosomensegregation
Topoisomerase III $\alpha, \beta$	IA	Rekombination, Reparatur

**Tabelle 1:** Humane DNA Topoisomerasen

torsionaler Spannung. Entspannte B-Form DNA, die natürliche Form der DNA in der lebenden Zelle, weist 10,4 Basenpaare pro Helixwindung auf. Superspiralisierte DNA besitzt eine davon abweichende Windungszahl. Der zirkuläre Charakter bakterieller und die Größe eukaryotischer Chromosomen verhindern die selbständige Entspannung der Superspiralisierung durch das Fehlen

frei rotierbarer Enden. Andererseits bedarf der Transkriptionsstart an einigen bakteriellen Promotoren eines definierten Grades an negativer Superspiralisierung. Der topologische Zustand der DNA muss demzufolge sehr genau reguliert werden um die Funktionsfähigkeit DNA-metabolischer Prozesse zu garantieren. Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten wird diese Funktion von speziellen Enzymen, den Topoisomerasen, ausgeführt (Überblick bei Champoux, 2001). Topoisomerasen schaffen durch das Schneiden des DNA-Stranges die notwendigen freien Enden um den topologischen Zustand der DNA zu ändern. Während der Schnittreaktion wird die Topoisomerase über eine Phosphodiesterbindung zwischen dem katalytisch aktiven Tyrosinrest und der Phosphatgruppe im DNA-Rückgrat kovalent mit der DNA verbunden. Je nachdem ob dabei ein Einzel- oder Doppelstrangbruch in die DNA eingeführt wird, unterscheidet man Typ I und II Topoisomerasen. Während Typ II und Typ IA Topoisomerasen in diesem Schnittkomplex stets an das 5'-Phosphatende der DNA gebunden sind, erfolgt bei den Typ IB Topoisomerasen die Anbindung an das 3'-Phosphatende. Unter physiologischen Bedingungen ist der Schnittkomplex nur sehr kurzlebig und wird durch die enzymvermittelte Religation des DNA-Strangbruches revertiert. Die multimeren Typ II Topoisomerasen benötigen für ihre katalytische Aktivität Energie in Form von ATP. Im Gegensatz dazu erfüllen die meist monomeren Typ I Topoisomerasen ihre Relaxierungsfunktion ohne zusätzlichen Energieverbrauch. Die erste Typ I Topoisomerase, das  $\omega$ -Protein von *E.coli*, wurde 1971 entdeckt (Wang, 1971); gefolgt von der Charakterisierung ähnlicher Enzyme in vielen anderen Organismen (Wang, 1982). In humanen Zellen wird die Regulation der DNA-Topologie während Replikation, Transkription, Rekombination und Chromosomensegregation von insgesamt sechs Topoisomerasen übernommen, wobei jeweils zwei Enzyme der Gruppe IA, IB und IIA vertreten sind (Wang, 1996) (Tabelle 1). Typ IIB Topoisomerasen konnten bis jetzt nur in Archaeobakterien nachgewiesen werden.

## 1.2. Die humane Topoisomerase I als Vertreter der Typ IB Topoisomerasen

Typ IB Topoisomerasen besitzen keine Sequenz- oder Strukturhomologie zu allen anderen Topoisomerasen, zeigen jedoch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zur Tyrosin-Rekombinase Familie (Cheng et al., 1998; Sherratt and Wigley, 1998). Funktionell unterscheiden sie sich von den Typ IA Topoisomerasen unter anderem durch den Mechanismus der Relaxierung

Enzym
Eukaryotische DNA Topoisomerase I
Vacciniavirus DNA Topoisomerase
Hyperthermophile eubakterielle DNA Topoisomerase V
Mammalische mitochondrielle Topoisomerase I

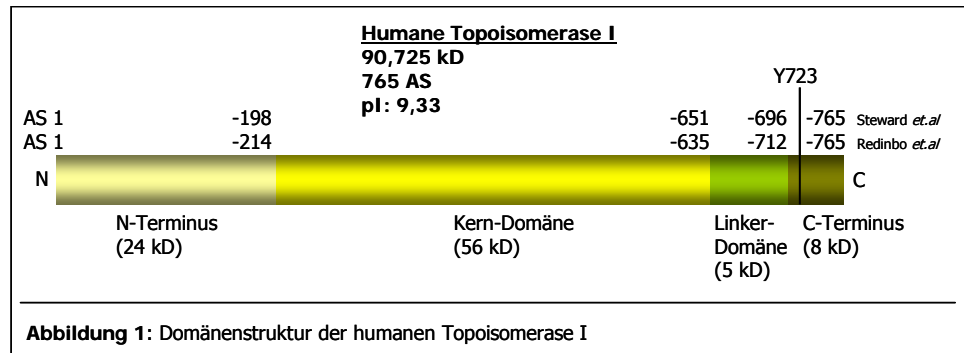
**Tabelle 2:** Vertreter der Typ IB Topoisomerasen

und die Bindung an das 3'-Phosphatende der DNA im Schnittkomplex. Des Weiteren sind sie in der Lage, sowohl negative als auch positive Superspiralisierung bis zur kompletten Entspannung der DNA aufzuheben. Die katalytische Aktivität ist unabhängig von Mg-Ionen und die DNA-Bindung bedarf keines

einzelsträngigen Bereiches. Vertreter der Typ IB Topoisomerasen sind sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten anzutreffen (Tabelle 2).

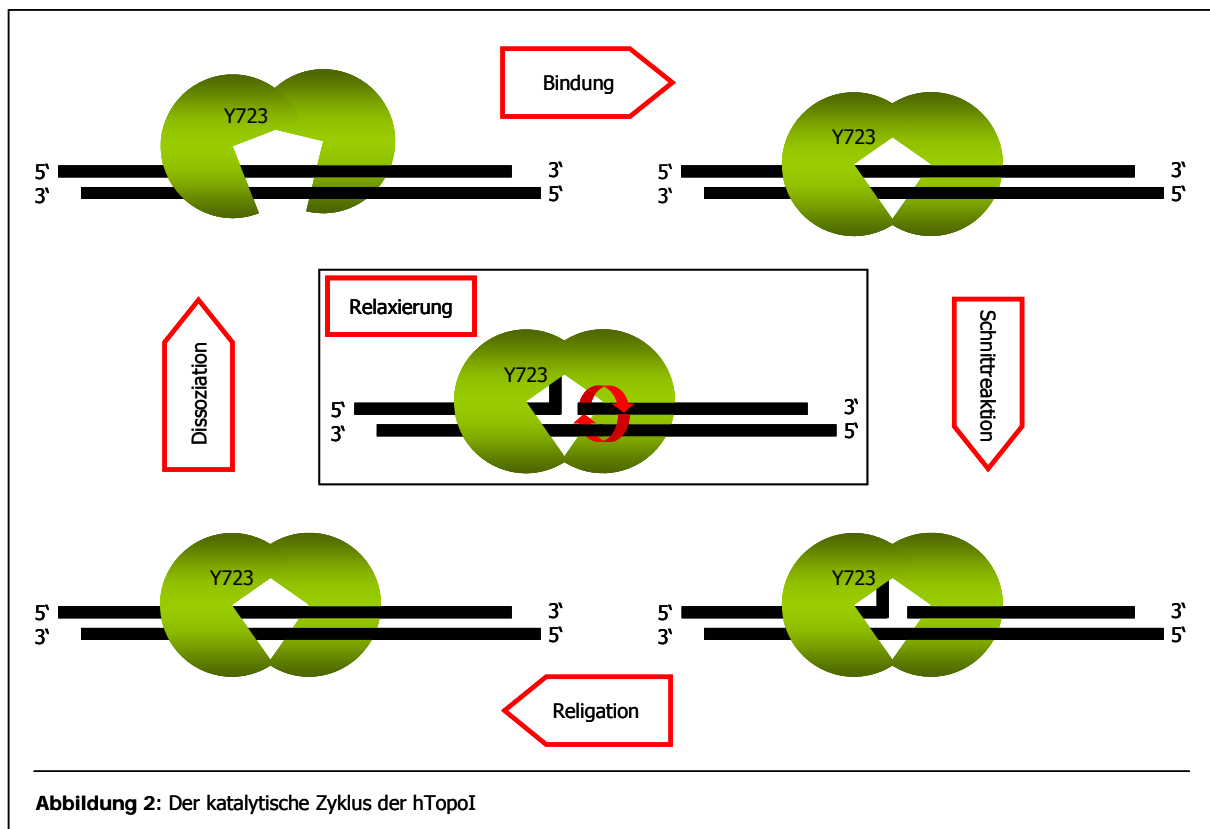
Die humane Topoisomerase I (hTopoI) wurde erstmals in den frühen 70er Jahren als „DNA untwisting enzyme“ beschrieben (Champoux and Dulbecco, 1972). 1981 wurde die Bezeichnung „Topoisomerase I“ eingeführt (Liu and Miller, 1981). Nach anfänglicher Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften des Enzyms gelang Ende der 90er Jahre auch die Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur. Die hTopoI kann strukturell in vier Domänen unterteilt werden (Abbildung 1). Dabei unterscheiden sich die Grenzen der einzelnen Regionen, die durch limitierte Proteolyse (Stewart et al., 1996a; Stewart et al., 1996b) oder kristallographisch (Redinbo et al., 1998) ermittelt

<b><u>Humane Topoisomerase I</u></b> 90,725 kD
---



Aktivität *in vitro* nicht essentiell. Hier sind die Kernlokalisationssequenzen der Topoisomerase und diverse Bindungsstellen mit Interaktionspartnern lokalisiert. Die N-terminale Domäne ist durch die Anwesenheit vieler geladener Aminosäurereste stark hydrophil, konnte kristallographisch aber noch nicht dargestellt werden. Die sich anschließende Kerndomäne ist hoch konserviert und vermittelt die DNA-Bindung des Enzyms. Weiterhin enthält sie alle Aminosäurereste des aktiven Zentrums (R488, K532, R590, H632), außer dem reaktiven Tyrosinrest (Y723), welcher sich im C-Terminus befindet. Kerndomäne und C-Terminus werden von einer protease-sensitiven und nur wenig konservierten Linker-Domäne verbunden. Die Kristallstruktur des hTopoI-DNA-Komplexes zeigt das Enzym als eine zweilippige Klammer, die die DNA-Duplex vollständig umgreift. Die Interaktion der Topoisomerase I mit der DNA umfasst etwa 14 Basenpaare, wobei die meisten Kontakte im Bereich von 5 Basen aufwärts der Schnittstelle erfolgen. Eine Sequenz von 5'-(A/T) (G/C) (A/T) (T)-3' wird bevorzugt gebunden und als Schnittstelle vor allem ein Thymidinrest oder auch ein Cytosinrest präferiert (Andersen et al., 1985; Been et al., 1984; Stevensner et al., 1989; Svejstrup et al., 1990). Die Substratspezifität der eukaryotischen Topoisomerase I umfasst aber nicht nur die Sequenz, sondern auch die Topologie der DNA. Die Topoisomerase besitzt entsprechend ihrer zellulären Funktion eine starke Bindungspräferenz für superspiralisierte, im Vergleich zu entspannter DNA (Camilloni et al., 1989; Madden et al., 1995). Dabei könnten Überkreuzungsstellen der Helix in superspiralisierter DNA eine bevorzugte Interaktionsstelle sein (Zechiedrich and Osheroff, 1990).

Der **katalytische Zyklus** (Abbildung 2) der hTopoI kann in DNA-Bindung, Schnittreaktion, Religation und Dissoziation unterteilt werden (Champoux, 2001; Leppard and Champoux, 2005). Dabei findet die Relaxierung der DNA zwischen dem Schnitt- und Religationsschritt statt. Nach dem Umschließen der DNA positionieren die vier Aminosäuren R488, K523, R590 und H632 des



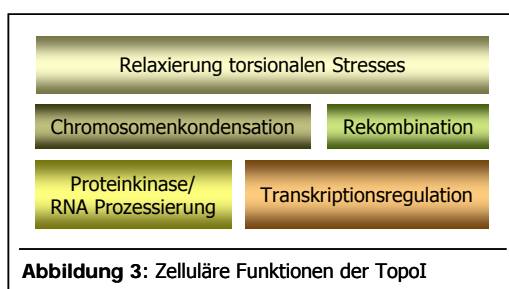
aktiven Zentrums die zu schneidende Phosphatbindung während des nukleophilen Angriffs des katalytisch aktiven Tyrosins (Y723). Durch eine Umesterungsreaktion wird die hTopoI kovalent an das 3'-Phosphatende des geschnittenen DNA-Stranges gebunden und ein freies 5'-OH Ende erzeugt. Dieses unter physiologischen Bedingungen nur sehr kurzlebige kovalente DNA-Enzym Intermediat wird als Schnittkomplex bezeichnet. Im Anschluss an die Einführung des Einzelstrangbruchs genügt die Spannung der superspiralisierten DNA um die Rotation des freien DNA-Endes um den intakten DNA-Strang zu erreichen. Das zurzeit bevorzugte Modell der Relaxierungsreaktion wird als „kontrollierter Rotationsmechanismus“ bezeichnet (Stewart et al., 1998). Dabei wird der Linker-Domäne eine Beeinflussung dieser Rotationsreaktion zugeschrieben (Sari and Andricioaei, 2005; Stewart et al., 1999). Ein alternatives Modell postuliert eine freie Rotation des DNA-Stranges, welche durch die strukturelle Flexibilität der Enzymdomänen ermöglicht werden könnte (Carey et al., 2003; Champoux, 2001; Woo et al., 2003). Ein Merkmal aller Typ IB Topoisomerasen ist die Fähigkeit, die Superspiralisierung bis zur vollständigen Entspannung der DNA aufzuheben. Wie viele Rotationen dabei jeweils pro Schnitt-Religationszyklus möglich sind, konnte für die hTopoI noch nicht bestimmt werden. Für die Vacciniavirus-Topoisomerase, einem weiteren Vertreter der Typ IB Topoisomerasen, wurden in verschiedenen Experimenten etwa fünf Rotationen (Stivers et al., 1997) bzw. neunzehn Rotationen (Koster et al., 2005) pro Zyklus nachgewiesen. Für die hTopoI konnte lediglich eine langsamere Rotationsrate im Vergleich zur Vacciniavirus-Topoisomerase festgestellt werden (Koster et al., 2005). Die enzymvermittelte Religation stellt die reverse Umesterung zur Schnittreaktion dar und sorgt für die Verschließung des Einzelstrangbruchs und die Aufhebung der kovalenten Bindung zwischen hTopoI und DNA.

Im Gegensatz zum Hefeenzym, ist die Topoisomerase I in höheren Eukaryoten essentiell. In *Drosophila* (Lee et al., 1993) und Maus (Morham et al., 1996) führt das Fehlen der Topoisomerase I zur Letalität in einem frühen Embryonalstadium. Das für die hTopoI kodierende Gen konnte auf Chromosom 20 identifiziert werden (Juan et al., 1988; Kunze et al., 1989) und umfasst 21 Exons, die sich über 85 kb genomische DNA erstrecken (Kunze et al., 1991). Die hTopoI gehört mit  $10^5$ - $10^6$  Molekülen pro Zellkern zu den abundanten zellulären Proteinen (Kunze et al., 1991) und wird konstitutiv in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert (Baker et al., 1995; Heck et al., 1988). Des Weiteren zeigten alle untersuchten humanen und murinen Gewebe (Leber, Niere, Gehirn, Herz, Lunge, Ovarien, Testes, Zunge und Mandeln) eine vergleichbare Aktivität der Topoisomerase I (Bronstein et al., 1996). Der Abbau des Enzyms erfolgt nach Ubiquitinylierung durch das 26S-Proteasom (Desai et al., 1997). Dabei konnte für das relativ stabile hTopoI-Protein eine Halbwertszeit von etwa 16 h in transformierten Zellen und 23 h in Primärzellen festgestellt werden (Heck et al., 1988). Verschiedene Studien identifizierten die eukaryotische Topoisomerase I als ein nukleäres Protein mit besonders hoher Konzentration in den Nukleoli (Christensen et al., 2004; Muller et al., 1985). Für diese subzelluläre Lokalisation spielt der N-Terminus eine wichtige Rolle, in dem sich verschiedene Kernlokalisierungssignale (Alsner et al., 1992; Christensen et al., 2002; Mo et al., 2000) sowie die Bindungsstelle für die RNA Polymerase I (Christensen et al., 2004) befinden. Weiterhin konnte hTopoI auch mit RNA Polymerase II assoziierten Transkriptionsfaktoren kopräzipitiert werden, die eine Rekrutierung zu Orten aktiver Transkription vermitteln könnten (Kretzschmar et al., 1993). Zudem ist die Topoisomerase I an Replikationsgabeln assoziiert und konnte als Bestandteil des multimeren Replikationskomplexes identifiziert werden (Wu et al., 1994). Daraus abgeleitet ergeben sich die prominentesten Funktionen (Abbildung 3) der hTopoI in der Entspannung der positiven Superspiralisierung, die sich vor-, bzw. negativen Superspiralisierung, die sich hinter voranschreitenden Transkriptions- und Replikationskomplexen bilden.

Da Typ IB Topoisomerasen strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zu den Rekombinasen besitzen und zudem im Zuge des katalytischen Mechanismus Einzelstrangbrüche induzieren, ist die Beteiligung an zellulären Rekombinationsvorgängen naheliegend. Des Weiteren wurde auch postuliert, dass Viren die zelluläre Topoisomerase I für die Integration in das Genom der Wirtszelle nutzen (Hino et al., 1989). Über die Relaxierungsfunktion hinaus besitzt die hTopoI eine Proteinkinaseaktivität, die sich nach heutigem Kenntnisstand auf Serinreste beschränkt. Dabei wird das Substratprotein über die N-terminale Domäne der hTopoI gebunden, während sich die ATP-Bindungsstelle im C-Terminus befindet (Labourier et al., 1998; Rossi et al., 1998). Als einziges Substrat konnte bisher der Splicingfaktor SF2/ASF (Splicingfaktor 2/ alternativer Splicingfaktor) identifiziert werden (Rossi et al., 1996). Eine daraus ableitbare, potentielle Involvierung in RNA-Prozessierungsvorgänge wird durch den Nachweis einer direkten Interaktion von hTopoI mit dem Splicing-Kofaktor PSF (Pyrimidintrakt-Bindeprotein assoziierter Splicingfaktor) unterstützt (Straub et al., 1998). Während die Assoziation mit PSF zur Steigerung



der hTopoI-Aktivität führt (Straub et al., 1998), inhibiert die Bindung an ihr Substrat SF2/ASF die Relaxierungsaktivität (Andersen et al., 2002). Über die genannten katalytischen Funktionen hinaus, kann die hTopoI auch als Transkriptionsmodulator fungieren. Dabei kann sowohl eine basale Transkriptionsrepression als auch eine Stimulation in Gegenwart von Transkriptionsaktivatoren erreicht werden (Merino et al., 1993). Vermittelt wird dies vor allem über die direkte Interaktion mit verschiedenen Untereinheiten des basalen Transkriptionsfaktors TFIID (Shykind et al., 1997). Neueste Forschungen zeigen, dass die hTopoI im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor und Onkoprotein c-Jun die Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR = epidermal growth factor receptor) positiv regulieren und somit das Wachstum entarteter Zellen fördern kann. Diese positive Regulation wird durch die Inhibition der Topoisomerase I mittels Topotecan (einem Camptothecin-Derivat) aufgehoben. Daraus ergibt



sich ein weiterer Mechanismus für die Antitumorwirkung von Topoisomerase-Toxinen (Mialon et al., 2005). Eine Rolle der hTopoI bei der Chromosomenkondensation könnte aus der Beteiligung des Hefehomologen an diesem Prozess abgeleitet werden (Castano et al., 1996).

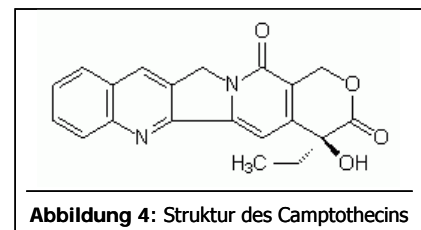
### 1.3. Die duale Natur der Topoisomerasen

Obwohl sich die zellulären Funktionen und katalytischen Mechanismen der verschiedenen Topoisomerasen unterscheiden, ist allen die Einführung von DNA-Strangbrüchen gemeinsam. Auch wenn die Regulation der DNA-Topologie eine wichtige Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit aller DNA-metabolischer Prozesse ist, sind DNA-Läsionen potentiell gefährlich für die Zelle. Um die genomische Integrität zu bewahren, wird das Enzym während der Schnittreaktion kovalent an eines der entstehenden DNA-Enden gebunden. Darüber hinaus ist der Schnittkomplex unter physiologischen Bedingungen ein nur kurzlebiges Intermediat. Im Zuge des enzymvermittelten Religationsschrittes kommt es zur Trennung der kovalenten Protein-DNA Bindung und zur Wiederherstellung der intakten DNA-Duplex. Bedingungen, die die Anzahl oder Lebenszeit bzw. Stabilität solcher Schnittkomplexe erhöhen, können schwerwiegende Folgen für die Zelle haben. Zum einen bleiben potentiell mutagene DNA-Läsionen länger erhalten, zum anderen können kovalente Protein-DNA-Komplexe zelluläre Prozesse zusätzlich behindern. Dementsprechend erfüllen Topoisomerasen zwar essentielle Funktionen in der Zelle, können aber gleichzeitig die genomische Stabilität gefährden (Überblick bei Larsen and Gobert, 1999).

Diese duale Natur der Topoisomerasen hat man sich in der klinischen Forschung zu Nutze gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stabilisierung der Schnittkomplexe durch die Einwirkung spezifischer Substanzen zum Absterben der Zelle führt. Viele heute in der Klinik eingesetzten Antibiotika und Chemotherapeutika beruhen in ihrer Wirkungsweise auf diesem

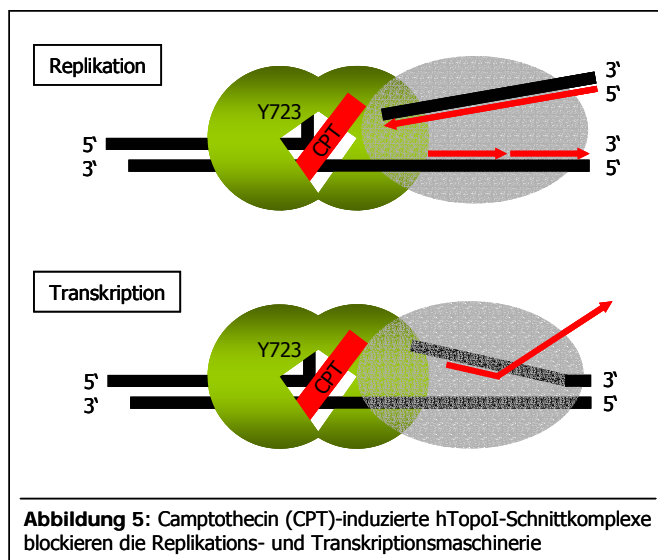
Mechanismus. So ist z.B. die bakterielle DNA-Gyrase das Ziel von Fluoroquinolonen, wie dem Ciprofloxacin, einem der wirksamsten oralen Antibiotika im klinischen Einsatz (Hooper and Wolfson, 1991). Chemotherapeutika, wie Etoposid, Doxorubicin, Amsacrin oder Mitoxantron werden routinemäßig bei der systemischen Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt. Diese Medikamente beruhen auf der spezifischen Stabilisierung von Topoisomerase II-Schnittkomplexen (Corbett and Osheroff, 1993). Im Unterschied zu anderen Pharmazeutika, die sich gegen zelluläre Enzyme richten, entfalten die oben genannten Stoffe ihre Wirkung jedoch nicht als Enzyminhibitoren im eigentlichen Sinne, indem sie die gesamte katalytische Aktivität der Topoisomerase blockieren. Vielmehr nutzen sie die katalytische Aktivität, um durch die Blockierung des kovalenten Reaktionsintermediates die Topoisomerase in ein zelluläres Toxin umzuwandeln. In der Literatur findet man deshalb zum Teil eine Unterscheidung zwischen Topoisomerase-Inhibitoren und -Toxinen (Froelich-Ammon and Osheroff, 1995). Entsprechend des Reaktionsmechanismus ist die Wirksamkeit von Topoisomerase-Toxinen umso stärker, je höher die intrazelluläre Anzahl an Topoisomerasemolekülen ist. Im Gegensatz dazu sind Zellen mit erhöhtem Topoisomeraseniveau resistenter gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren. Deshalb eignen sich Topoisomerase-Toxine vor allem bei der Behandlung aggressiver Tumore mit hochreguliertem Topoisomerasegehalt.

Mitte der 60er Jahre wurde das zytostatisch wirkende Alkaloid Camptothecin (Abbildung 4) im Extrakt des chinesischen Glücksbaumes (*Camptotheca Acuminata*) entdeckt (Wall et al., 1966). Trotz einer guten Antitumorwirksamkeit im Tiermodell mussten die klinischen Studien in den frühen 70er Jahren aufgrund massiver Nebenwirkungen abgebrochen werden (Gottlieb and Luce, 1972; Muggia et al., 1972). Erst Ende der 80er Jahre konnte das zelluläre Zielprotein des Camptothecins, die humane Topoisomerase I, identifiziert werden (Hsiang et al., 1985; Hsiang and Liu, 1988). Diese Entdeckung führte im Laufe der vergangenen Jahre zur Entwicklung



nebenwirkungsärmerer Camptothecin-Derivate mit verbesserter Antitumorwirksamkeit (Lorence and Nessler, 2004). In der Klinik eingesetzte Derivate sind das Topotecan oder Irinotecan, welche vor allem bei der Behandlung von Ovarial-, Lungen- oder Colonkrebs zu den erfolgversprechendsten Chemotherapeutika zählen (Garcia-Carbonero and Supko, 2002). Die Topoisomerase I-Aktivität variiert stark zwischen verschiedenen Tumorarten, sowie zwischen verschiedenen Patienten mit dem gleichen Tumor. Dabei kann die gesteigerte Aktivität durch ein erhöhtes Protein- oder mRNA-Niveau sowie eine Erhöhung der Genkopiezahl bedingt sein (Bronstein et al., 1996; Husain et al., 1994; McLeod and Keith, 1996). Das Expressionsniveau der hTopoI eignet sich also nicht als Tumormarker per se, da nicht alle Tumore einen gesteigerten Proteingehalt aufweisen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Tumore mit erhöhtem hTopoI-Gehalt sensibler auf die Behandlung mit Camptothecin-Derivaten reagieren.

Die Wirkung des Camptothecins beruht auf der **Stabilisierung von hTopoI-Schnittkomplexen**. Durch die reversible Interaktion mit dem ternären Enzym-DNA Intermediat wird die Religationsreaktion verhindert. Die so entstandenen langlebigen Protein-DNA-Komplexe können das Voranschreiten der Replikations- und Transkriptionsmaschinerie blockieren, vor allem dann, wenn sie auf der Leitstrangmatrize bzw. dem kodierenden Strang lokalisiert sind (**Abbildung 5**). Im Falle einer Transkriptionsblockade führt dies zum frühzeitigen Abbruch des Elongationsprozesses und zur Freisetzung trunkierter Transkripte (**Bendixen et al., 1990; Wu and Liu, 1997**). Im Zuge der Kollision mit Replikationsgabeln kann der zunächst reversible Einzelstrangbruch im Schnittkomplex in einen potentiell irreversiblen Doppelstrangbruch umgewandelt werden (**Hsiang et al., 1989**). Überschreitet die Anzahl der Doppelstrangbrüche die Reparaturkapazität der Zelle, wird der apoptotische Zelltod induziert. Deshalb werden die replikationsinduzierten Doppelstrangbrüche für die zytotoxische Wirkung des Camptothecins



verantwortlich gemacht und man spricht von einer S-Phase abhängigen Toxizität. Darüber hinaus konnten unter anderem die Induktion eines G2/M-Zellzyklusarrestes, die Hochregulation von p53, eine Phosphorylierung von Chk1 (Checkpoint Kinase 1) und RPA (Replikationsprotein A) sowie die Aktivierung von NFκB (Nukleärer Faktor κ B) als mögliche Folgen der Kollision mit Replikationsgabeln beobachtet werden (**Überblick bei Li and Liu, 2001**).

#### 1.4. Die hTopoI-Schadensantwort

Etwa zehn Jahre nach der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von hTopoI-Toxinen, wie dem Camptothecin, beobachtete man erstmals auch eine Akkumulation stabilisierter Schnittkomplexe nach Einführung von DNA-Schäden. Die ersten Experimente zeigten eine Inhibierung der hTopoI-Relaxierungsaktivität nach Einführung von Photoaddukten in ein Substratplasmid durch UVC-Bestrahlung. Die resultierende Anhäufung von Schnittkomplexen wurde mit der Blockierung des Religationsschrittes analog zum Camptothecin begründet (**Lanza et al., 1996**). In den darauf folgenden Jahren wurden die Untersuchungen auf ein großes Spektrum an DNA-Läsionen erweitert (**Tabelle 3**). Analoge Ergebnisse zu den UVC-induzierten DNA-Schäden konnten unter Einsatz von Plasmid-DNA mit Fehlpaarungen, abasischen Stellen (**Pourquier et al., 1997b**), Strangbrüchen und -lücken (**Lebedeva et al., 2006; Pourquier et al., 1997a; Yeh et al., 1994**), oxidativen Schäden (**Daroui et al., 2004; Pourquier et al., 1999**), Basenalkylierung (**Pourquier et al., 1998; Pourquier et al., 2001; Rosenstein et al., 1997**) bzw. nach Einsatz von Interkalatoren

(Pommier et al., 2002) und Einbau von Nukleosid-Analoga (Pourquier et al., 2002; Pourquier et al., 2000) erhalten werden. Da die Schnitt/Religationsreaktion der Topoisomerasen stark von der DNA-Topologie beeinflusst wird, wurde die lokale Konformationsänderung in der Nähe eines DNA-Schadens als mögliche Ursache für die Entstehung stabilisierter Schnittkomplexe beschrieben.

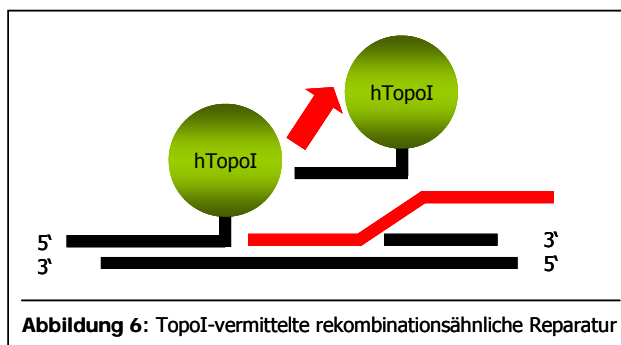
Der erste Hinweis auf eine physiologische Relevanz dieser Reaktion war der Nachweis stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe in Kulturzellen nach Exposition mit UVB-Strahlung (Rosenstein et al., 1997; Subramanian et al., 1998). Entsprechend wurde für diese zelluläre Reaktion der Terminus „hTopoI-Schadensantwort“ eingeführt. Im Laufe der vergangenen Jahre erfolgten einige weitere Untersuchungen, die eine hTopoI-Schadensantwort nach UVC-Bestrahlung (Søe et al., 2004), Induktion oxidativer DNA-Schäden (Daroui et al., 2004; Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004c) oder Basenaddukten (Miao et al., 2006; Pommier et al., 2000b) sowie nach Einbau von Nukleosid-Analoga (Liao et al., 2005; Pourquier et al., 2002; Pourquier et al., 2000) zeigen konnten. Anhand der *in vitro* Experimente wurde ein Mechanismus für die hTopoI-Schadensantwort postuliert, der die direkte Erkennung der DNA-Läsion durch die hTopoI voraussetzt bzw. den DNA-Schaden als Ursache für die Stabilisierung des Schnittkomplexes ansieht. In der Literatur finden sich jedoch auch Hinweise, die dieser Theorie widersprechen. So konnte trotz gleichem DNA-Schadenslevel eine verringerte hTopoI-Schadensantwort in Zellen mit DNA-Reparaturdefekten (Subramanian et al., 1998) oder Proteindeletionen (Mao et al., 2000a; Rockstroh et al., 2006; Rosenstein et al., 1997) im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypzelllinien beobachtet werden.

<i>In vitro</i> Experimente	<i>In vivo</i> Experimente
UVC-Strahlung	UVB- und UVC-Strahlung
Strangbrüche	AraC
Lücken	Benzo[a]pyren
Fehlpaarungen	MNNG
abasische Stellen	Gemcitabin
Ethenoaddukte	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Basenoxidation	Arsenik
Benzo[a]pyren	Staurosporin
Interkalatoren	FdUMP
Tripelhelices	4NQO

**Tabelle 3:** DNA-schädigende Agenzien bzw. Läsionen, die zur Formierung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe führen

Über die zelluläre Rolle der hTopoI-Schadensantwort und ihre Regulation ist bisher nur wenig bekannt. Eine Involvierung in den Mechanismus der Induktion des Zelltodes durch Nukleosid-Analoga wurde diskutiert (Pourquier et al., 2002; Pourquier et al., 2000). Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Einleitung des apoptotischen Zelltodes und der Kinetik der Schnittkomplexbildung konnte inzwischen gezeigt werden (Søe et al., 2004). Darüber hinaus könnte den stabilisierten hTopoI-Schnittkomplexen sogar eine aktive Rolle bei der apoptotischen DNA-Fragmentierung zukommen (Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004c). Andererseits wäre auch eine Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen denkbar. Unterstützend dahingehend ist der beschriebene Zusammenhang zwischen einem Defekt im Nukleotidexzisionsreparaturweg und der verringerten Fähigkeit zur Schnittkomplexbildung nach UV-Bestrahlung (Subramanian et al.,

1998). Des Weiteren konnten eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung, sowie eine verringerte Reparaturkapazität der resultierenden Photoaddukte, nach Reduktion des zellulären hTopoI-Proteinniveaus beobachtet werden (Mao and Muller, 2003). Dabei wurde eine Funktion als Schadenssensor, Rekrutierungsfaktor für Reparaturproteine oder bei der Regulation der DNA-Topologie während des Reparaturprozesses diskutiert. Der mit der Bildung eines hTopoI-Schnittkomplexes einhergehende DNA-Einzelstrangbruch könnte ferner ein Ausgangspunkt für illegitime Rekombinationsprozesse sein. Bisher zeigten zumindest *in vitro* Versuche eine sehr effiziente Induktion von Rekombinationsreaktionen durch hTopoI, die in Anwesenheit von p53 zusätzlich stimuliert werden. Die Bildung eines so genannten Doppelschnittkomplexes, bei dem zwei hTopoI-Moleküle die DNA in unmittelbarer Nähe zueinander schneiden, könnte solche Rekombinationsreaktionen auch *in vivo* begünstigen. Dabei führt die Freisetzung des distalen hTopoI-Schnittkomplexes nach dem Schneiden der zweiten hTopoI zur Entstehung einer mehrere Nukleotide langen Lücke, die als Hybridisierungsmatrize für einen fremden DNA-Strang dienen kann (Søe et al., 2001; Søe et al., 2002; Stephan et al., 2002). Bisher bestehen jedoch nur indirekte Hinweise auf die Existenz dieser Topoisomerase I-induzierten rekombinations-ähnlichen



Reparatur (TIRR) in der Zelle (Abbildung 6) (Søe et al., 2006). So könnten z.B. die genomischen Rearrangements nach Exposition mit ionisierender Strahlung (Radford, 2002) sowie die typischen Translokationen bei der promyeloischen Leukämie (Boehden et al., 2004) Folge

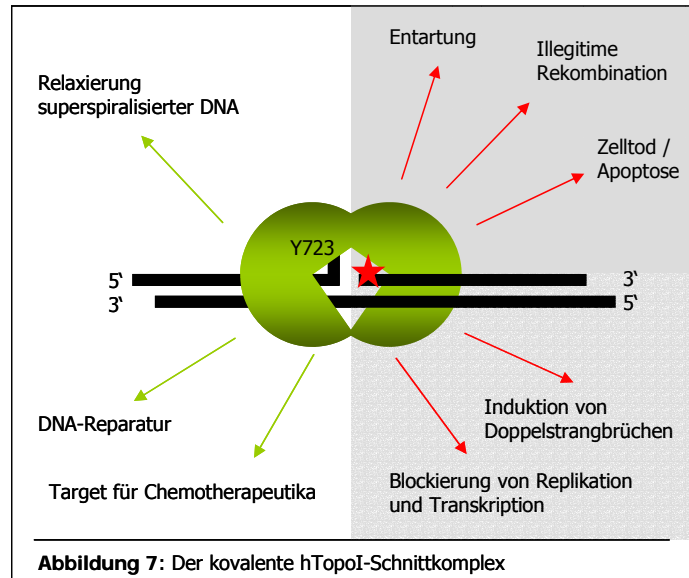
solcher Rekombinationsprozesse sein. Die Fähigkeit zur Vermittlung von Rekombinationsereignissen spiegelt sich nicht zuletzt in der zunehmenden Verwendung von TopoI-basierten Klonierungsassays wider (Geng et al., 2006).

Alles in allem scheint die Stabilisierung kovalenter hTopoI-DNA-Komplexe deutliche Auswirkungen auf die Zellvitalität bzw. genomische Stabilität zu besitzen (Abbildung 7). Ein möglicher Zusammenhang könnte dahingehend auch mit Ergebnissen bestehen, die eine erhöhte Sensitivität von Hefezellen gegenüber DNA-alkylierenden Substanzen nach Überexpression von Topoisomerase I zeigen. Im Gegensatz dazu waren Topoisomerase I-defiziente Stämme, bzw. Stämme mit katalytisch inaktivem Enzym, nach gleicher Behandlung resistenter (Pourquier et al., 2001); (Nitiss et al., 2001). Weiterhin führte die ektopische Expression von Topoisomerase I in defizienten Hefen zur Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid (Daroui et al., 2004). Nicht zuletzt konnte eine Herabregulation des zellulären hTopoI-Proteinniveaus mit einer verminderten apoptotischen DNA-Fragmentierung in Zusammenhang gebracht werden (Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004c). Der Nachweis einer TopoI-Schadensantwort in nicht humanen Zellen (Hamster (Pourquier et al., 2001), Maus (Pourquier et al., 2000) und Frosch

(Rosenstein et al., 1997)) deutet zudem auf eine weitreichende Rolle dieser zellulären Reaktion hin.

#### 1.5. Die Regulation der hTopoI bzw. hTopoI-Schadensantwort durch posttranslationale Modifikation

Stabilisierte hTopoI-Schnittkomplexe besitzen ein mutagenes Potential (Überblick bei Li and Liu, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die letale Wirkung Toxin-induzierter Schnittkomplexe drastisch verstärkt wird, wenn die Kollision mit Replikationsgabeln zur Induktion von Doppelstrangbrüchen führt. Illegitime Rekombinationsprozesse können zum Schwesterchromatidaustausch führen, Insertionen oder Deletionen



verursachen sowie chromosomale Aberrationen und Translokationen hervorrufen. Führen diese weit reichenden genomischen Veränderungen nicht zur Induktion des Zelltodes, kann es zur kanzerogenen Entartung der Zelle kommen. Zur Erhaltung der genomischen Integrität sollte die Zelle deshalb Mechanismen besitzen, um die Formierung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe streng zu regulieren bzw. bestehende Enzym-DNA-Komplexe effektiv zu entfernen. Eine Regulation zellulärer Prozesse kann dabei grundsätzlich über posttranslationale Modifikationen oder Protein-Protein-Interaktionen erreicht werden.

Die hTopoI stellt in der lebenden Zelle ein **Phosphoprotein** dar, welches als Substrat der Serin/Threonin spezifischen Casein Kinase II (Kowalska-Loth et al., 2003); (Cardellini et al., 2004) und Protein-Kinase C (Cardellini and Durban, 1993; Samuels et al., 1989) sowie der c-Abl Tyrosinkinase (Yu et al., 2004) identifiziert werden konnte. Die Existenz einer hyperphosphorylierten Form des Proteins, welche vor allem während der Mitose nachgewiesen werden kann, wurde als Hinweis auf eine zusätzliche Phosphorylierung durch mitotische Kinasen diskutiert (D'Arpa and Liu, 1995). Die katalytische Aktivität der eukaryotischen Topoisomerase I ist stark vom Phosphorylierungsstatus abhängig, wobei ausschließlich eine Aktivitätssteigerung nach Serin/Threonin-Phosphorylierung beobachtet wurde (Durban et al., 1985). Im Gegensatz dazu kann die Phosphorylierung an Tyrosinresten sowohl zu einer Aktivitätssteigerung (Yu et al., 2004) als auch zu einer Verminderung der Aktivität (Chuang et al., 1996; Tse-Dinh et al., 1984) führen. Eine Stimulation der Phosphorylierung durch Protein-Kinase C nach Behandlung mit Phorbolestern war in humanen und murinen Kulturzellen nachweisbar (Cardellini and Durban, 1993; Samuels and Shimizu, 1992) und geht mit einer Steigerung der katalytischen Aktivität



einher (Gorsky et al., 1989). Trotzdem konnte ein Zusammenhang zur Entstehung stabilisierter Schnittkomplexe noch nicht belegt werden bzw. existieren noch keine Informationen über den Phosphorylierungsstatus der Topoisomerase im Schnittkomplex. Die Kinase c-Abl phosphoryliert den Tyrosinrest 268 der hTopoI insbesondere unter Bedingungen von genotoxischem Stress. Die Substratfunktion für c-Abl könnte somit als Anhaltspunkt für einen Zusammenhang zur zellulären Stressreaktion dienen (Søe et al., 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung alleine nicht für die Stabilisierung von Schnittkomplexen ausreichend ist (Yu et al., 2004).

Eine Poly(ADP)ribosylierung der TopoI aus Kalbsthymus, die mit einer Verringerung der katalytischen Aktivität des Enzyms verbunden ist, wurde erstmals 1983 nachgewiesen (Ferro et al., 1983). Die Analyse einer zu 50% inhibierten TopoI-Population enthielt 1 bis 2 Poly(ADP)riboseketten je Protein mit einer durchschnittlichen Länge von 7,4 Resten (Ferro and Olivera, 1984). Experimente mit HeLa Zellextrakten bestätigten die Poly(ADP)ribosylierung für eine Subpopulation der chromatingebundenen humanen Topoisomerase I, die ebenfalls mit einer verringerten Aktivität einhergeht (Kasid et al., 1989). Das modifizierende Enzym, die Poly(ADP)Ribose-Polymerase 1 (PARP1) wird durch DNA-Strangbrüche oder Unterbrechungen der doppelhelikalen DNA-Struktur aktiviert und gilt als eines der Schützerproteine der Genomintegrität (Bürkle, 2005). Entsprechend kann kurz nach Induzierung von DNA-Schäden eine transiente Poly(ADP)ribosylierung der TopoI beobachtet werden (Krupitza and Cerutti, 1989; Yung et al., 2004). In humanen Zellen konnte nach Exposition mit ionisierender Strahlung sogar ein Komplex aus Topoisomerase I und p53 präzipitiert werden, in welchem für beide Proteine eine Poly(ADP)ribosylierung nachweisbar war (Smith and Grosovsky, 1999). Außerdem wurde die beobachtete verminderte Aktivität der hTopoI nach Exposition mit ionisierender und UV-Strahlung auf die Modifizierung mit Poly(ADP)ribose zurückgeführt (Boothman et al., 1994). Dabei korrelierte das Ausmaß der Aktivitätsverminderung mit der Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung. In diesem Zusammenhang wurde bereits in frühen Forschungen die biologische Funktion der Poly(ADP)ribosylierung von TopoI diskutiert. Topoisomerasen induzieren DNA-Strangbrüche, die wiederum nach Stabilisierung des Schnittkomplexes Ausgangspunkt für illegitime Rekombinationsereignisse sein können. Die Poly(ADP)ribosylierung und dadurch Inhibierung der hTopoI könnte somit einer Entstehung weiterer Strangbrüche nach DNA-Schädigung entgegenwirken. Des Weiteren wurde die Poly(ADP)ribosylierung als Mechanismus zur Inhibierung der DNA-Replikation nach DNA-Schädigung diskutiert (Ferro et al., 1984a; Ferro et al., 1984b). Unabhängig davon konnte die poly(ADP)ribosylierte hTopoI als Bestandteil des multimeren Replikationskomplexes identifiziert werden (Simbulan-Rosenthal et al., 1998). Beide Möglichkeiten der biologischen Funktion würden der Erhaltung der genomischen Integrität dienen und der Entstehung von stabilisierten Schnittkomplexen entgegenwirken. Die Beobachtung, dass eine Inhibierung von PARP1 die Zytotoxizität von Camptothecin verstärkt, passt gut in dieses Bild (Bowman et al., 2001; Mattern et al., 1987). Neuere Erkenntnisse postulieren sogar eine

Revertierung stabilisierter Schnittkomplexe durch Poly(ADP)ribosylierung (Malanga and Althaus, 2004). Die hohe negative Ladung, die durch die Poly(ADP)ribose auf das Enzym übertragen wird, würde dabei eine Ablösung von der DNA begünstigen. In frühen *in vitro* Experimente konnten unter optimalen Reaktionsbedingungen mehr als 20 ADP-Ribose Moleküle und damit 40 negative Ladungen auf die Kalbsthymus-TopoI übertragen werden (Ferro and Olivera, 1984). Die Poly(ADP)ribosylierung stellt somit einen potentiellen negativen Regulator der Schnittkomplexbildung dar. Neueste Forschungen wiesen darüber hinaus auf eine negative Regulation von hTopoI-induzierten Rekombinationsereignissen durch die Interaktion mit PARP1 hin (Baumann et al., 2006).

Während eine basale Monosumoylierung der hTopoI auch unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden kann, wird durch die Behandlung mit Camptothecin der Anteil sumoylierter hTopoI-Moleküle deutlich erhöht. Besonders ist dabei die Modifizierung der hTopoI mit einer einzelnen polymeren Sumokette, die in einem Schritt von der entsprechenden Ligase übertragen wird (Yang et al., 2006). Als Hauptsumoylierungsstellen konnten die Lysinreste 117 und 153 im N-Terminus des Proteins identifiziert werden (Horie et al., 2002; Rallabhandi et al., 2002). Nach Camptothecinbehandlung kann ein Teil der sumoylierten hTopoI-Moleküle in den kovalenten Komplexen mit der DNA nachgewiesen werden (Horie et al., 2002; Mao et al., 2000b). Während diese posttranslationale Modifikation von Horie *et al.* als ein Mechanismus zur Verstärkung der hTopoI-Schnittkomplexbildung vorgeschlagen wird (Horie et al., 2002), postulieren Mao *et al.* eine Rolle in deren Reparatur (Mao et al., 2000b). Andere Studien diskutieren eine Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation der hTopoI, da nach Camptothecinbehandlung eine Delokalisation des Proteins vom Nukleolus ins Nukleoplasma beobachtet werden kann (Mo et al., 2002; Rallabhandi et al., 2002). Der proteasomale Abbau der hTopoI erfolgt nach Polyubiquitylierung durch das 26S-Proteasom und kann verstärkt nach Camptothecinbehandlung beobachtet werden (Desai et al., 2001; Desai et al., 1997). Zu weiteren posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung oder Anderen, ist bisher nichts bekannt.

#### 1.6. Die Regulation der hTopoI bzw. hTopoI-Schadensantwort durch Protein-Protein-Interaktionen

Bedingt durch die Gegenwart der hTopoI bei grundlegenden Prozessen des DNA-Metabolismus konnten als Interaktionspartner viele Proteine der Replikations- und Transkriptionskomplexe nachgewiesen werden. Die Interaktion mit abundanten Proteinen des Chromatins, wie Histon H1, HMG1, 2 und 17 oder Nukleolin ergibt sich durch die subzelluläre Lokalisation und die DNA-Bindung der hTopoI. Die bereits genannten posttranslationalen Modifikationen bedürfen außerdem einer Wechselwirkung mit den entsprechenden modifizierenden Enzymen, wie PARP1 (Poly(ADP)Ribosylierung), UBC9 (Sumoylierung), Topors (Ubiquitylierung) und diversen

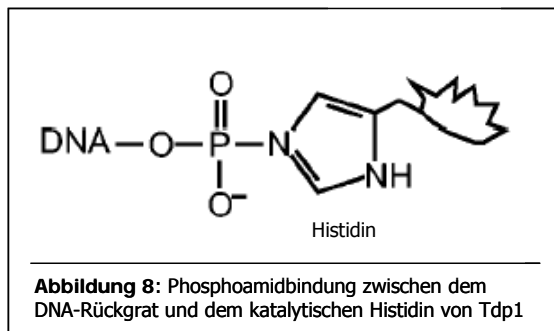


Proteinkinasen. Für die Regulation der hTopoI-Schadensantwort potentiell interessante Interaktionspartner stellen jedoch vor allem Proteine der zellulären Schadens- oder Stressreaktionen dar. Als bedeutendster Vertreter ist dabei das Tumorsuppressorprotein p53 als Interaktionspartner der hTopoI nachgewiesen worden (Gobert et al., 1996). Während die hTopoI-Bindestelle im p53-Protein zwischen den Aminosäuren 302 und 321 lokalisiert ist (Gobert et al., 1999), bindet p53 die hTopoI im Bereich der Aminosäuren 156-170 im N-Terminus (Mao et al., 2002; Søre et al., 2002). *In vitro* Experimente zeigen eine Stimulation der Relaxierungsaktivität der hTopoI in Gegenwart von p53 (Gobert et al., 1996), wobei vor allem die Ablösung der hTopoI von der DNA beschleunigt wird (Søre and Grosse, 2003). Eine deutliche Abhängigkeit der Interaktion zwischen p53 und hTopoI vom p53-Status der Zelle ist ferner zu beobachten. In Zelllinien mit Wildtyp-p53 wird die Wechselwirkung räumlich und zeitlich streng reguliert und erfolgt als Antwort auf genotoxischen Stress. Im Gegensatz dazu konnte eine permanente Assoziation beider Proteine in Zelllinien mit mutiertem p53 nachgewiesen werden (Gobert et al., 1999). Da p53 darüber hinaus die hTopoI-vermittelten Rekombinationsprozesse begünstigen kann (Boehden et al., 2004; Stephan et al., 2002), sind durch die Interaktion beider Proteine bedeutsame Auswirkungen auf die zelluläre Stressantwort und genomische Stabilität denkbar.

Die Beobachtung, dass der zelluläre p53-Status ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die hTopoI-Schadensantwort hat, unterstreicht dies zusätzlich (Mao et al., 2000a; Rockstroh et al., 2006). Nach Exposition mit UVC-Strahlung konnte die hTopoI-Schnittkomplexbildung in Zellen mit Wildtyp-p53 detektiert werden, während in p53-defizienten Zellen nach gleicher Behandlung kaum eine hTopoI-Schadensantwort nachweisbar war. Die Wiedereinführung von funktionellem p53 führte dabei zur Wiederherstellung der hTopoI-Antwort. Verschiedene p53-Mutationen scheinen hingegen sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen zu haben. Während Mao *et al.* keine hTopoI-Schadensantwort in logarithmisch wachsenden SKBR3 Zellen mit funktionell-inaktivem p53 nachweisen konnten, deuten Experimente der eigenen Arbeitsgruppe auf eine differenzierte Induktion von Schnittkomplexen in Abhängigkeit der p53-Mutation hin (nicht publizierte Daten, Diplomarbeit Astrid Kleinert). Die Beeinflussung der hTopoI-Schadensantwort durch Aktivierung p53-abhängiger Zellzykluskontrollpunkte, wie von Mao postuliert, könnte damit in Zusammenhang stehen. Der Nachweis einer direkten Bindung von p53 an den Schnittkomplex unterstreicht zusätzlich die zentrale Bedeutung bei der Regulation der hTopoI-Schadensantwort (Mao et al., 2000a). Zusammenfassend scheint p53 ein wichtiger positiver Regulator der hTopoI-Schadensantwort zu sein.

Neben der Fähigkeit einer positiven und negativen Regulation der hTopoI-Schnittkomplexbildung, sollten sich in der Zelle auch Mechanismen entwickelt haben, bereits stabil kovalent gebundene Topoisomerasen entfernen zu können. Die Tyrosyl-DNA-

**Phosphodiesterase 1 (Tdp1)** wurde erstmals als Enzym beschrieben, welches die Phosphodiesterbindung im Topoisomerase I-Schnittkomplex der Hefe spalten kann. Inzwischen konnten entsprechende Homologe in vielen Organismen, wie auch dem Menschen nachgewiesen werden. Aufgrund des Vorkommens des HKD-Motivs in der Aminosäuresequenz, wird Tdp1 der



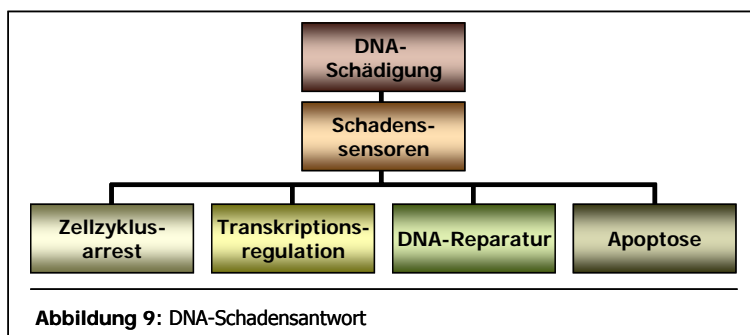
Phospholipase D Superfamilie zugeordnet (Interthal et al., 2001). Dabei schneidet das Enzym vornehmlich 3'-Phosphatbindungen, die typisch für DNA-gebundene Typ IB Topoisomerasen sind (Yang et al., 1996). Durch einen nukleophilen Angriff des katalytisch aktiven Histidinrestes von Tdp1 könnte das 3'-Phosphat

vom Tyrosin der Topoisomerase abgelöst und über eine Phosphoramidbindung an Tdp1 selbst geknüpft werden (Abbildung 8). Die Hydrolyse dieses Reaktionsintermediates könnte anschließend durch ein Wassermolekül erfolgen, welches mittels eines zweiten Histidinrestes aktiviert wird. Als Reaktionsprodukt würde somit ein freies 3'-Phosphatende an der DNA entstehen. Umfassende Charakterisierungen der Bindungseigenschaften von Tdp1 belegen zusätzlich die spezifische Interaktion mit dem Schnittkomplex und nicht mit der freien Topoisomerase (Barthelmes et al., 2004). Folglich wäre eine Funktion in der Reparatur stabilisierter Topoisomerase-Schnittkomplexe naheliegend. Dahingehend wurde die durch Tdp1 katalysierte Ablösung kovalent gebundener Topoisomerasen als initialer Schritt der von XRCC1 (X-ray cross complementing factor 1) und PARP1 vermittelten humanen Einzelstrangbruchreparatur diskutiert (Plo et al., 2003). Unterstützend ist auch, dass eine Überexpression von humanem Tdp1 zur erhöhten Resistenz gegenüber Camptothecin führt und gleichzeitig die Anzahl resultierender DNA-Strangbrüche verringert wird (Barthelmes et al., 2004). Es konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, dass das gebundene, intakte Topoisomerase-Protein nur ein schlechtes Substrat für Tdp1 darstellt (Debethune et al., 2002). *In vivo* müsste die Topoisomerase im Schnittkomplex deshalb zunächst teilweise degradiert oder modifiziert werden, um effizient entfernt werden zu können (Davies et al., 2003). Neueste Ergebnisse unterstützen trotzdem die Wichtigkeit von Tdp1 bei der Reparatur chromosomaler Einzelstrangbrüche, die durch abortive Topoisomeraseaktivität hervorgerufen werden. Eine Mutation des humanen Tdp1-Proteins konnte als Ursache für die Ausprägung der vererblichen neurodegenerativen Erkrankung SCAN1 (spinozerebellare Ataxie mit axonaler Neuropathie-1) identifiziert werden (Takashima et al., 2002). Die entsprechende Mutation (H493R) führt zu einer drastischen Reduktion der katalytischen Aktivität des Enzyms und einer Hypersensitivität von SCAN1 Zellen gegenüber Camptothecin (Interthal et al., 2005). SCAN1 Lymphoblastoiden zeigen eine atypisch hohe Akkumulation von Strangbrüchen nach Behandlung mit Camptothecin und scheinen diese auch nach Entfernung der aktiven Substanz aus dem Medium nicht effizient reparieren zu können. Entsprechend wurde die Beteiligung von Tdp1 an einem humanen Multiproteinkomplex zur

Einzelstrangreparatur postuliert, der in SCAN1 Zellen durch die Mutation von Tdp1 inaktiv ist (El-Khamisy et al., 2005). In Hefezellen wurden darüber hinaus weitere potentielle Reparaturmöglichkeiten für Topoisomerase-Schnittkomplexe diskutiert, die eine Beteiligung der klassischen DNA-Reparaturprozesse beinhalten (Pouliot et al., 2001; Vance and Wilson, 2002).

### 1.7. Die zelluläre Schadensantwort

Zur Erhaltung der Integrität des Erbmateri­als besitzen Zellen eine Vielzahl an Mechanismen um auf schädigende endogene oder exogene Einflüsse zu reagieren (Überblick bei Begley and Samson, 2004; Schärer, 2003). Je nach Art und Ausmaß der Schädigung werden Zellzykluskontrollpunkte und DNA-Reparatursysteme aktiviert bzw. wird der apoptotische Zelltod eingeleitet um einer Entartung der Zelle entgegenzuwirken. Schätzungen haben ergeben, dass in einer einzelnen menschlichen Zelle etwa  $10^4$ – $10^6$  DNA-Schädigungsereignisse pro Tag stattfinden, was demnach in einem erwachsenen Menschen ( $10^{12}$  Zellen) etwa  $10^{16}$ – $10^{18}$  Reparaturprozesse nach sich ziehen muss (Friedberg et al., 1995). Das Proteinnetzwerk der DNA-Schadensantwort (Abbildung 9) stellt jedoch nur einen Teil der komplexen globalen Schadensantwort der Zelle dar. Denn auch andere zelluläre Makromoleküle, wie die RNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide, besitzen reaktive Gruppen, die als Angriffspunkt modifizierender Agenzien dienen. Geschädigte Makromoleküle jeglicher Art müssen repariert, entfernt oder ersetzt werden, um die volle Funktionsfähigkeit zellulärer



Prozesse zu gewährleisten. Dies bedarf einer koordinierten Aktion verschiedener Vorgänge, wie der Transkriptionsregulation, der intermolekularen Interaktion und der posttranslationalen Modifikation.

Schädigungen der DNA können Modifikationen der Nukleobasen oder des Rückgrates, sowie Strangbrüche und Crosslinks umfassen. Die einfachste Reaktion, die die Integrität der DNA gefährdet, ist die Hydrolyse der glycosidischen Bindung von Purinnukleotiden. Die so entstandenen abasischen Stellen haben die genetische Information verloren und können demzufolge während der Replikation zu Mutationen führen (Loeb and Preston, 1986). Die Häufigkeit spontan generierter abasischer Stellen in einer humanen Zelle wurde auf etwa 10.000 pro Tag geschätzt (Nakamura et al., 1998). Reaktionen des normalen Zellmetabolismus können zur Alkylierung oder Oxidation von Nukleobasen führen. Darüber hinaus kann die Exposition mit UV-Strahlung oder mutagenen Substanzen die Bildung verschiedenster Basenaddukte hervorrufen. Schädigungen am DNA-Rückgrat entstehen vorwiegend durch Oxidation der Desoxyribose, die mehrere Stellen mit einer hohen Reaktivität gegen Sauerstoffradikale enthält

und resultieren meist in Strangbrüchen. Neben reaktiven Sauerstoffspezies erzeugen auch ionisierende Strahlung und radiomimetische Arzneimittel Strangbrüche im DNA-Rückgrat. Doppelstrangbrüche können auch bei der Replikation entstehen, wenn Replikationsgabeln an DNA-Schäden kollabieren oder durch z.B. hTopoI-Schnittkomplexe blockiert werden. Doppelstrangbrüche stellen eine spezielle Herausforderung für die Reparaturmaschinerie der Zelle dar, da im Unterschied zu den vorher beschriebenen Läsionen beide DNA-Stränge beschädigt sind und somit kein Partnerstrang als Matrize für die Reparatur zur Verfügung steht. Ein weiterer Läsionstyp, der beide DNA-Stränge betrifft, ist der Interstrang-Crosslink, der sich durch eine kovalente Bindung zwischen zwei gegenüberliegenden DNA-Basen auszeichnet. Interstrang-Crosslinks sind hoch zytotoxisch, da sie Transaktionen wie DNA-Replikation und -Transkription, bei denen die Separierung der beiden DNA-Stränge erforderlich ist, verhindern. Solche komplexen DNA-Schäden werden in Eukaryoten von Reparaturwegen behoben, die auf **homologen oder nicht-homologen Rekombinationsprozessen** beruhen (**Überblick bei Khanna and Jackson, 2001; van Gent et al., 2001**). Die homologe Rekombination (HR) stellt einen intrinsisch exakten Reparaturweg dar, bei dem die fehlende genetische Information durch Nutzung des Schwesterchromatids oder des homologen Chromosoms als Matrize ersetzt wird. Im Gegensatz dazu ist die nicht-homologe Rekombination (NHEJ = non-homologous end joining) ein konzeptuell einfacher, jedoch nicht exakter Weg, der die Religation gebrochener DNA-Enden ohne Homologie zur Matrize einschließt.

Durch **direkte Schadensumkehr** können in Säugern nur wenige alkylierte Basen (**Überblick bei Aas et al., 2003; Duncan et al., 2002**) repariert werden, wobei die Alkylgruppe irreversibel auf eine spezialisierte Transferase übertragen wird. Die Reparatur anderer Läsionen bedarf der koordinierten Aktion verschiedener Reparaturproteine, die neben der bereits erwähnten Rekombinationsreparatur der Fehlpaarungs- (MMR = mismatch repair), der Basenexzisions- (BER) und der **Nukleotidexzisions-Reparatur (NER)** (**Überblick bei Hanawalt, 2002; Sancar, 1996**) zugeordnet werden können. Mittels NER werden sterisch anspruchsvolle Basenaddukte aus der DNA entfernt, die z.B. durch UV-Licht, Umweltmutagene und Chemotherapeutika verursacht werden. In Hefezellen wurde zudem eine Beteiligung bei der Entfernung von TopoI-Schnittkomplexen diskutiert. (**Pouliot et al., 2001**) Die NER umfasst die Erkennung des DNA-Schadens, das Ausschneiden eines Oligonukleotids von 24 bis 32 Nukleotiden Länge, sowie die Reparatursynthese und die Ligation der resultierenden Lücke. Die Reparatur nicht aktiv transkribierter DNA, die den Großteil der genomischen DNA ausmacht, wird durch den globalen Genomreparaturweg (GGR) der NER ausgeführt. Bei aktiv transkribierten Genen werden Schäden im Matrizenstrang durch einen speziellen transkriptionsgekoppelten Reparaturweg (TCR = transcription coupled repair) besonders effizient entfernt.

Die DNA-Replikation ist ein hochkomplexer und präziser Prozess mit einer Gesamtfehlerrate von nur 1 zu  $10^{10}$ . Replikative Polymerasen fügen ungefähr 1 fehlerhaftes Nukleotid pro  $10^5$

Nukleotide ein. Die mit der Polymerase assoziierte 3'-5'-Korrekturlesefunktion reduziert diese Fehlerrate weiter um den Faktor 100, indem fehlgepaarte Nukleotide entfernt werden, bevor der neu synthetisierte Strang weiter verlängert wird. Die verbleibende Verringerung der Fehlerrate um den Faktor  $10^3$  wird durch die **Fehlpaarungsreparatur** (Überblick bei Jiricny, 2006; Stojic et al., 2004) ermöglicht, die von Polymerasen eingefügte Basenfehlpaarungen sowie Nukleotid-Deletionen und –Insertionen eliminiert. Gegenwärtigen Modellen zufolge ist die MMR-Maschinerie eng mit dem Replikationsapparat gekoppelt, was vermutlich zur Identifizierung des neu synthetisierten Stranges genutzt wird. Weiterhin wird auch die Reparatursynthese nach endonukleolytischem Abbau des fehlerhaften DNA-Stranges von der Replikationsmaschinerie ausgeführt.

Schäden an DNA-Basen als Folge von Desaminierung, Oxidation und Alkylierung werden hauptsächlich im Rahmen der **Basenexzisionsreparatur** (Überblick bei Dianov et al., 2001; Schärer and Jiricny, 2001) entfernt. Die Initiation dieses Reparaturweges erfolgt durch die spezifische Bindung der beschädigten Base durch eine DNA-Glykosylase. Bisher sind neun humane DNA-Glykosylasen

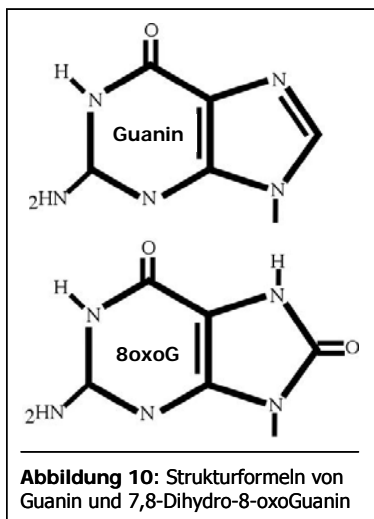
charakterisiert worden, von denen jede eine einzigartige Substratspezifität aufweist (Tabelle 4). Monofunktionale Glykosylasen können durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung die beschädigte Base aus der DNA ausschneiden

Enzym		wichtigste Substrate	bifunktional
<b>UNG</b>	uracil-N-glycosylase	Uracil 5-Hydroxyuracil	nein
<b>SMUG1</b>	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1	Uracil 5-Hydroxyuracil	nein
<b>TDG</b>	thymidine-DNA-glycosylase	U:G, T:G	nein
<b>MBD4</b>	methyl-CpG-binding protein 4	U:G, T:G	nein
<b>OGG1</b>	8oxoG-glycosylase	8oxoG:C	ja
<b>MYH</b>	MutY DNA glycosylase homologue/ adenine-DNA-glycosylase	8oxoG:A	nein
<b>NTH1</b>	endonuclease III homologue 1	oxidierte Pyrimidine	ja
<b>NEI1</b>	nei endonuclease VIII-like 1	oxidierte Pyrimidine	ja
<b>AAG</b>	3-alkyladenine-DNA glycosylase	3-Methylalanin 7-Methylguanin	nein

**Tabelle 4:** Humane DNA-Glykosylasen

und so eine abasische Stelle als Produkt hinterlassen. Bifunktionale Glykosylasen, welche sich durch eine zusätzliche AP-Lyaseaktivität (AP = apurinisch) auszeichnen, können außerdem das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA spalten. Die AP-Endonuklease 1 (APE1) hydrolysiert anschließend die Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrates, wodurch ein Einzelstrangbruch als Reparaturintermediat entsteht. Im wichtigsten BER-Pfad, der „Short-Patch“ Reparatur, ersetzt die Polymerase  $\beta$  ein einziges Nukleotid und der verbleibende Einzelstrangbruch wird durch die DNA-Ligase III verschlossen. Ein zweiter Weg, die so genannte „Long-Patch“ Reparatur, verläuft unter Beteiligung der Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ , die zwei bis sechs Nukleotide nachfolgend zur abasischen Stelle einfügen. Das somit entstandene überhängende Oligonukleotid wird von der Flap-Endonuklease 1 (FEN-1) abgetrennt und der Einzelstrangbruch durch DNA-Ligase I verschlossen.

**Reaktive Sauerstoffspezies** (ROS = Superoxid-Radikalanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) stellen eine besondere Gefahr für die zelluläre DNA dar, da sie permanent im Rahmen des normalen aeroben Metabolismus entstehen und zusätzlich durch die Einwirkung exogener Faktoren freigesetzt werden können. Das induzierte Schadensspektrum reicht von oxidierten Basen über abasische Stellen bis hin zu DNA-Strangbrüchen. Des Weiteren wurden oxidative DNA-Schäden mit neurodegenerativen Krankheiten, Alterungsprozessen (Barja, 2004) sowie der Mutagenese und der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht (Marnett, 2000; Raha and Robinson, 2000). Die Oxidation von Guanin zu 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8oxoG) (Abbildung 10) stellt dabei die häufigste und gefährlichste endogene Basenläsion in aeroben Organismen dar. In jeder Säugetierzelle entstehen etwa 180 8oxoGs pro Tag (Lindahl, 1993). Bei der Replikation kann es zur Fehlpaarung des 8oxoG mit Adenin kommen, was im Zuge weiterer Replikationsrunden die Manifestation einer Transversionsmutation zur Folge hat (Cheng et al., 1992); (Grollman and Moriya, 1993). Solche G:C zu T:A Transversionen können häufig in



humanen Tumoren nachgewiesen werden, die ein defektes p53-Protein besitzen (Hollstein et al., 1996). Oxidative Schäden können im Zellkultursystem durch Exposition mit verschiedenen Chemikalien hervorgerufen werden. Dabei besitzen die meisten Substanzen jedoch ein relativ großes Schadensspektrum. Ein vergleichsweise spezifischer Induktor für 8oxoG-Schäden ist die photoreaktive Substanz Ro19-8022 (synthetisiert von U. Widmer, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz; nach Fischer et al. 1990) (Abbildung 11). Chemische Analysen zeigen, dass etwa 70% der in Kulturzellen eingeführten Basenläsionen 8oxoG-Schäden darstellen (Will et al., 1999).

8oxoGs werden hauptsächlich durch den Mechanismus der BER entfernt (Dianov et al., 2001). Dabei wirken drei Enzyme in einem hochkoordinierten Dreistufensystem dem potentiell mutagenen Effekt von 8oxoG entgegen. Zum einen entfernt die **8oxoG-Glykosylase 1** (OGG1) spezifisch Cytidin-gepaartes 8oxoG und beugt dadurch der Fehlpaarung mit Adenin in nachfolgenden Replikationszyklen vor. Zum anderen kann die MYH-Glykosylase (MutY Homologes) bereits fehleingebaute, mit 8oxoG-gepaarte Adenin-Basen entfernen. Außerdem sorgt die 8oxo-dGTP-Phosphatase MTH (MutH Homologes), für die Hydrolyse und somit Entfernung von noch nicht eingebautem 8oxo-dGTP aus dem Nukleotidpool der Zelle. Die ersten Knock-out Mausmodelle mit defekten BER-Proteinen umfassten Enzyme, die stromabwärts der DNA-Glykosylasen arbeiten. Diese Gendefekte führten zur Letalität in einem frühen Embryonalstadium, was auf die essenzielle Funktion der entsprechenden Proteine hindeutet (Wilson and Thompson, 1997). Hingegen wurde überraschenderweise festgestellt, dass Mäuse mit Defekten in verschiedenen DNA-Glykosylasen keine phänotypischen Abnormalitäten und keine signifikant erhöhte spontane Karzinogeneserate aufweisen. In den Leberzellen



homozygoter *OGG1* Knock-out-Mäuse konnte allerdings eine deutlich erhöhte Frequenz spontaner Transversionsmutationen beobachtet werden (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass in der Abwesenheit von OGG1 keine andere DNA-Glykosylase 8oxoG-Basen entfernen kann. Die Beobachtung einer sehr langsamen Reparaturfähigkeit von 8oxoG-Schäden *in vivo* gibt jedoch Hinweise auf die Existenz eines alternativen zellulären Reparaturweges, wenn OGG1 defekt ist

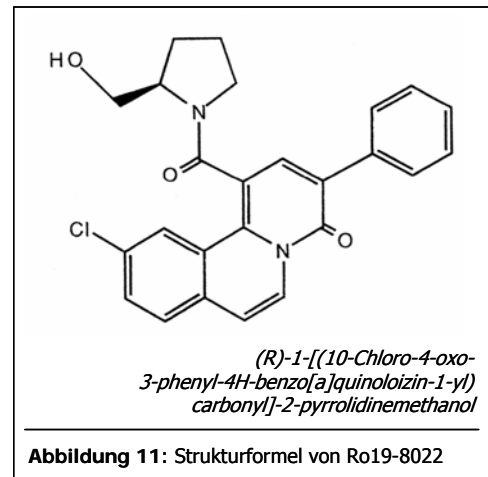


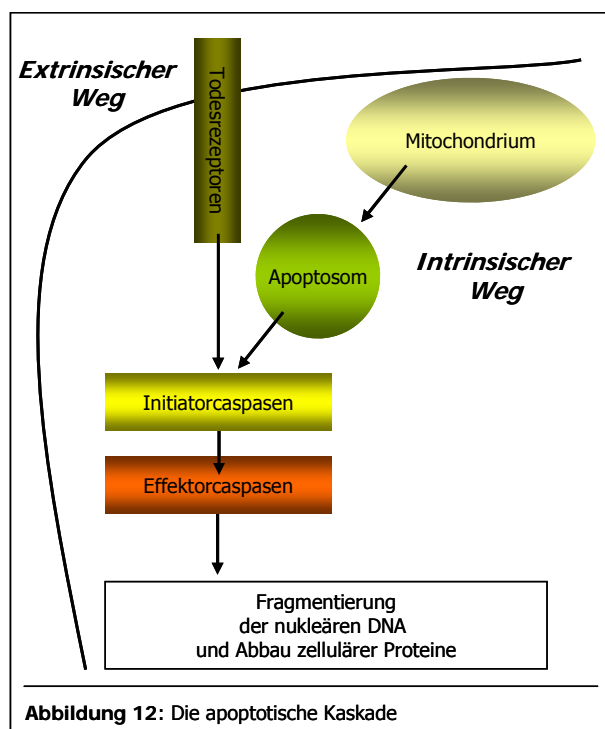
Abbildung 11: Strukturformel von Ro19-8022

(Klungland et al., 1999). Trotzdem wird die besondere Bedeutung der OGG1-Glykosylase auch dadurch veranschaulicht, dass sowohl in humanen Lungen- als auch Nierentumoren häufig Mutationen im entsprechenden Gen nachgewiesen werden können (Chevallard et al., 1998). Polymorphismen im *OGG1* Gen konnten ebenfalls mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko in Verbindung gebracht werden (Sugimura et al., 1999). Des Weiteren geht auch eine verringerte Enzymaktivität, gemessen in peripheren Lymphozyten, mit einer Prädisposition für die Ausprägung von Lungenkrebs einher (Paz-Elizur et al., 2003). Der Verlust der Heterozygotität des *OGG1* Genlokus scheint außerdem ein häufiges Kennzeichen humaner Hals- und Kopf Tumore zu sein (Blons et al., 1999).

### 1.8. Der programmierte Zelltod / Apoptose

Sind Reparaturwege defekt oder übersteigt das Schadensmaß die Kapazität der zellulären Reparatursysteme, so kann der programmierte Zelltod eingeleitet werden, um einer Entartung entgegenzuwirken. Ebenso müssen von Viren oder Bakterien befallene Zellen effektiv entfernt werden, um eine Verbreitung der Infektion im Gewebe zu verhindern. Das kontrollierte Absterben von Zellen im Gewebeverband ist ebenfalls unerlässlich während der Embryonalentwicklung und zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase multizellulärer Lebewesen. Die Apoptose ist der genetisch regulierte Prozess, der die sichere Beseitigung von Zellen erlaubt, die ihre biologische Funktion verloren haben. Die grundlegenden Vorgänge des apoptotischen Zelltodes sind im Pflanzen- und Tierreich konserviert. Neuere Studien weisen sogar auf die Existenz eines elementaren apoptotischen Programms in einzelligen Lebewesen hin. Als biologische Funktion wird hier die Selektion der vitalsten Vertreter einer Population diskutiert (Frohlich and Madeo, 2000). Im Menschen kann die Fehlregulation des apoptotischen Programms zur Entstehung schwerwiegender Krankheiten führen. Ein übermäßiges Absterben von Nervenzellen resultiert in der Ausprägung neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer. Hingegen kann eine verminderte Apoptose geschädigter oder überflüssiger Zellen zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten, zu Entzündungsreaktionen oder zur Tumorentstehung führen (Jaattela, 2004).

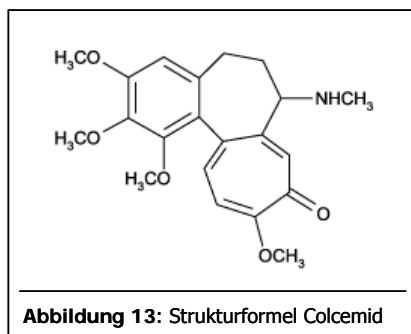
Die kontrollierte apoptotische Degradation von Zellen unterscheidet sich dabei morphologisch und physiologisch vom zufälligen, plötzlichen Absterben geschädigter Zellen, der Nekrose (Nicotera and Melino, 2004). Die Existenz verschiedener Formen des Zelltodes wurde bereits 1859 von Virchow beobachtet (Virchow and Chandler, 1859). Jedoch erst 1972 wurden von Kerr und Wyllie der Terminus Apoptose eingeführt und die charakteristischen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle zusammengefasst (Kerr et al., 1972). Dazu gehören die Schrumpfung des Zellkörpers, die Kondensation des Chromatins und der Zerfall der Zelle in kleine membranumgrenzte Vesikel (Apoptosekörperchen). Diese können von Immunzellen spezifisch erkannt und phagozytiert werden. Während des gesamten apoptotischen Prozesses bleibt die Integrität der Zellmembran erhalten, wodurch die vollständige Beseitigung aller Zellüberreste ohne Freisetzung des Zellinhaltes in das umliegende Gewebe ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu kommt es beim nekrotischen Tod zur Ruptur der Zellmembran gefolgt von einer lokalen Entzündungsreaktion, die aufgrund der freigesetzten Zellbestandteile entsteht. Die Auslöser des apoptotischen Programms können sowohl intra- als auch extrazellulärer Natur sein und werden von verschiedenen Proteinnetzwerken und Signalwegen detektiert (Abbildung 12) (Jin and El-Deiry, 2005). Das Herzstück der apoptotischen Maschinerie stellt jedoch immer eine sich selbst verstärkende Kaskade spezifischer Proteasen dar. Die Bezeichnung Caspasen leitet sich von der Zugehörigkeit zur Gruppe der Cysteinproteasen und der Spaltungsspezifität nach Aspartatresten ab (Chang and Yang, 2000). Extrazelluläre Botenstoffe, z.B. Zytokine, können Membranrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Superfamilie aktivieren, die wiederum direkt über ihre intrazelluläre Domäne die Caspasen-Kaskade in Gang setzen können (Ashkenazi and Dixit, 1998). Schädigungen der DNA oder anderer Makromoleküle sowie zelluläre Stresssituationen werden durch spezifische Sensormoleküle detektiert und signalisiert (Norbury



and Zhivotovsky, 2004). Eine besondere Rolle im Aktivierungsprozess der Caspasen-Kaskade kommt hierbei dem Mitochondrium zu (Wang, 2001). Die Depolarisation und Permeabilisierung der Mitochondrienmembran sind Voraussetzungen für die Freisetzung proapoptotischer Faktoren. Reaktive Sauerstoffspezies, die im Mitochondrium im Zuge der Atmungskette entstehen, wirken dabei als zusätzliche Beschleuniger des apoptotischen Programms. Die Aktivierung der Caspasen-Kaskade erfolgt in einem zwei Stufen Prozess. So genannte Initiatorcaspasen stehen am Anfang der Kaskade und sammeln die proapoptotischen Stimuli. Die



anschließende Aktivierung der Effektorcaspasen setzt die regulierte Zerstörung zellulärer Bestandteile in Gang. In frühen Phasen der Apoptose ist das „Blebbing“ der Zellmembran durch den Abbau strukturgebender Membranproteine morphologisch zu beobachten (Huppertz et al., 1999). Die spezifische Degradation zellulärer Proteine kann im Western-Blot verfolgt werden. Als typischer Apoptosemarker hat sich der Nachweis der charakteristischen Spaltung von PARP1 durch apoptotische Effektorcaspasen etabliert (Kaufmann et al., 1993; Shah et al., 1996). Auch die hTopoI wird im Zuge der Apoptose durch die Caspasen 3 und 6 spezifisch gespalten, wobei eine N-terminal trunkierte Form des Enzyms entsteht (Samejima et al., 1999). Kennzeichen der fortgeschrittenen Apoptose ist die oligonukleosomale Degradation der nukleären DNA. Die Aktivität der entsprechenden DNase CAD/DFF40 (Caspase aktivierte DNase / DNA-Fragmentierungsfaktor 40) wird in vitalen Zellen durch die Bindung des spezifischen Inhibitorproteins ICAD/DFF45 (Inhibitor von CAD) erreicht. Die proteolytische Spaltung des Inhibitors durch Caspase 3, setzt die aktive Nuklease in sterbenden Zellen frei (Enari et al., 1998). Obwohl ein vielfältiges Spektrum an apoptotischen Charakteristika vornehmlich aus der Aktivität der Caspase 3 resultiert, sind Caspase 3-defiziente Zellen, wie die MCF7 Zelllinie (Jänicke et al., 1998), nicht gleichzeitig apoptosedefizient (Kagawa et al., 2001). Oft kann das Fehlen



eines Effektors durch die redundanten Funktionen apoptotischer Caspasen kompensiert werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die durch Caspase 3 vermittelte Spaltung von ICAD essentiell für die Aktivierung der apoptotischen DNase und somit Voraussetzung für die charakteristische oligonukleosomale Fragmentation der DNA ist (Tang and Kidd, 1998; Wolf et al., 1999).

In den mitochondriellen Apoptoseweg münden auch Signalkaskaden, die von zellulären Stresssituationen ausgehend zur Auslösung des programmierten Zelltodes führen. Zu den Substanzen die den intrinsischen Apoptoseweg unabhängig von einer Schädigung der DNA induzieren können, gehören z.B. die Mikrotubuli-interferierenden Agenzien Colchicin und Taxol (Mollinedo and Gajate, 2003). Diese Substanzen stören durch Interaktion mit den Mikrotubuli deren normale Funktion bei der Bildung des Zytoskelettes und der Mitosespindel. Ein weniger toxisches Derivat des Colchicins, das Colcemid (Abbildung 13), wirkt entzündungshemmend und wird bei der Behandlung der myeloischen Leukämie sowie äußerlich bei gutartigen oder neoplastischen Zellwucherungen auf der Haut eingesetzt. Die spezifische Bindung von Colcemid an Tubulindimere verhindert deren Polymerisierung zu Mikrotubuli, welche eine Hauptkomponente des Spindelapparates darstellen. Durch das Fehlen polymerer Mikrotubuli kann keine funktionsfähige Mitosespindel ausgebildet werden, was zunächst zu einem Zellzyklusarrest in der Metaphase führt. Diese Art der Arretierung des Zellzyklus wird bei der Erstellung von Karyogrammen genutzt. Bei dauerhafter Exposition von Colcemid in höheren Dosen führt der persistierende Zellzyklusarrest zur Auslösung des programmierten Zelltodes (Sherwood et al.,

1994). Dabei sind die Proteine des Spindel-Assemblierungs-Kontrollpunktes mit apoptotischen Signalwegen vernetzt (Mollinedo and Gajate, 2003). Des Weiteren wird eine Beteiligung der Caspase 2 bei der Aktivierung des mitochondriellen Signalweges diskutiert (Castedo et al., 2004). Colcemid soll in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um die Apoptose DNA-schadensunabhängig auszulösen.

## 2. Zielstellung

Das Vorhandensein verschiedener Mechanismen der zellulären Schadens- oder Stressantwort ist für die Erhaltung der genomischen Stabilität und die Vermeidung kanzerogener Entartung von großer Bedeutung. Dabei existiert in der Zelle ein komplexes Netzwerk an Proteinfaktoren, die als Schadenssensoren, Signalüberträger, direkte Reparaturvermittler oder Exekutoren des programmierten Zelltodes fungieren. Seit Anfang der 90er Jahre gibt es Hinweise auf die Beteiligung der eukaryotischen Topoisomerase I an einem potentiell neuen Weg der zellulären Stressantwort. Die Induktion des apoptotischen Zelltodes durch die Stabilisierung des kovalenten Reaktionsintermediates der Topoisomerase I ist ein Mechanismus, der der Wirkungsweise vieler klinisch erfolgreich angewandter Chemotherapeutika und Antibiotika zu Grunde liegt. Über den Mechanismus der Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe unter zellulären Stressbedingungen, sowie deren Regulation und Funktion, ist bisher nur wenig bekannt. Das Auftreten einer großen Anzahl kovalenter Protein-DNA-Komplexe stellt eine enorme Herausforderung für die Zelle dar. Der Ablauf wichtiger DNA-metabolischer Prozesse wie Transkription und Replikation kann dadurch gestört oder verhindert werden. Zusätzlich geben die mit stabilisierten hTopoI-Schnittkomplexen einhergehenden Einzelstrangbrüche die Möglichkeit zu Rekombinationsprozessen, die zum Vor- oder Nachteil der Genomintegrität gereichen können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe in Kulturzellen unter verschiedenen Bedingungen von genotoxischem und zellulärem Stress untersucht werden. Dabei ist besonders die Langzeitkinetik der hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Einführung unterschiedlich starker zellulärer Schädigung interessant. Ein hauptsächliches Augenmerk gilt hierbei zunächst der Verbindung zur Apoptoseinduktion. Die Einleitung des programmierten Zelltodes mit Hilfe diverser Stimuli kann wichtige Hinweise auf den Mechanismus der Schnittkomplexstabilisierung geben. Zudem ermöglicht die Untersuchung der zeitlichen Korrelation zum Auftreten prominenter Apoptosemarker erste Rückschlüsse auf die Funktion der hTopoI-Schadensantwort. Die Quantifizierung der gebildeten hTopoI-Schnittkomplexe kann dabei zusätzliche Anhaltspunkte liefern. Nicht zuletzt sollen potentielle Einflussfaktoren auf die Ausprägung der hTopoI-Schadensantwort untersucht werden. Hierzu steht eine Zelllinie mit einem Defekt eines DNA-Reparatursystems zu Verfügung.

Die Stabilisierung von Schnittkomplexen durch spezifische hTopoI-Toxine hat einen massiven Einfluss auf zelluläre Prozesse und führt zur Induktion der Apoptose. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen einem besseren Verständnis der Bedeutung der Bildung stabilisierter hTopoI-DNA-Komplexe unter physiologischen Bedingungen dienen. Eine Involvierung der hTopoI-Schadensantwort in das Netzwerk der zellulären Stressantwort gibt neue Ansatzpunkte für die Diskussion von Regulationsmechanismen in der Zelle.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinien erfolgte in beschichteten Zellkulturflaschen oder Petrischalen (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) bei 37°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit (NuAire IR Autoflow; Nu Aire™, Minnesota, USA) unter sterilen Arbeitsbedingungen (Steril-Gard Biological Safety Cabinet [Class II Type A/B3]; The Baker Company, Sanford, Main). Die Cervixkarzinomzelllinien HeLa S3 und HeLa p0 sowie die embryonalen Mausfibroblasten (MEF) wurden in DMEM Medium (c.c.pro GmbH, Neustadt / Weinstraße) bei 10% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die Anzucht der Glioblastom- (T98G) und Mammakarzinomzellen (MCF7) erfolgte in RPMI Medium (c.c.pro GmbH, Neustadt / Weinstraße) bei 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die Versorgung mit den benötigten Wachstumsfaktoren konnte durch Zusatz von 10% sterilem, hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) fetalem Kälberserum (Gibco™, Karlsruhe) in das Kulturmedien erreicht werden. Zur Subkultivierung oder Zellerente wurde der Zellrasen durch Inkubation mit 1x PBS + 10 mM EDTA und 1x Trypsin (0,25% in 1x PBS, c.c.pro GmbH, Neustadt / Weinstraße) abgelöst.

**1x PBS pH 7,4**  
 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 3 mM KCl  
 137 mM NaCl

#### 3.2. Verwendete Zelllinien

HeLa-S3	humane, epithel-ähnliche Cervixkarzinomzelllinie; adhärenent (Puck et al., 1956) Kultivierung in DMEM Medium + 10% FCS, 10% CO <sub>2</sub> (ATCC, Wesel)
HeLa p0	von HeLa abgeleitete Zelllinie ohne mitochondrielle DNA (Hayashi et al., 1992) Kultivierung in DMEM Medium mit 110 mg/l Pyruvat und 4,5 g/l Glucose (D6429; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) supplementiert mit 10% FCS und 4 µg/ml Uridin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) (von Prof. L. Rasmussen, Roskilde Universität, Dänemark)
MCF7	humane Mammakarzinomzelllinie; adhärenent (Soule et al., 1973) Kultivierung in DMEM Medium + 10% FCS, 10% CO <sub>2</sub> (ATCC, Wesel)

T98G	<p>humane Glioblastomzelllinie; adhären</p> <p>(Stein, 1979)</p> <p>Kultivierung in RPMI Medium + 10% FCS, 5% CO<sub>2</sub></p> <p>(ATCC, Wesel)</p>
MEF	<p>embryonale Mausfibroblasten; adhären</p> <p>Wildtyp und homozygote <i>OGG1</i><sup>-/-</sup> Knock-out Zelllinie</p> <p>(Klungland et al., 1999)</p> <p>Kultivierung in DMEM Medium + 10% FCS, 10% CO<sub>2</sub></p> <p>(von Prof. A. Klungland, Oslo, Norwegen und Prof. B. Epe, Universität Mainz)</p>

### 3.3. Behandlung der Zellen

Die Zellgifte Colcemid (Fluka, Buchs SG, Schweiz) und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (Biomol GmbH, Hamburg) wurden in DMSO bzw. Wasser gelöst und unmittelbar dem Kulturmedium zugesetzt. Zur Bestrahlung mit UVC-Licht (254 nm) (UV-Stratalinker 1800; Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurde der Zellrasen mit einem dünnen Film 1x PBS überschichtet (Schichtdicke ~5 mm). Die Kontrollzellen wurden mit den entsprechenden Mengen an Lösungsmitteln behandelt bzw. zeitgleich mit PBS inkubiert. Ro19-8022 wurde in absolutem Ethanol zu einer Stammlösung von 25 mM gelöst und in 1x PBS verdünnt. Für die Behandlung mit der photoreaktiven Substanz Ro19-8022 (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz) wurde der Zellrasen mit 1x PBS gespült und für 2 min in der verdünnten Ro19-8022 Lösung vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit einer 1000 W Halogenleuchte (düwii GmbH, Breckerfeld) in einem Abstand von 47 cm für 10 min auf Eis. Das entspricht einer Strahlungsdosis von etwa 111 kJ/qm im sichtbaren Wellenlängenspektrum (400 – 800 nm) (Will et al., 1999). Nach der Bestrahlung wurde der Zellrasen mit 1x PBS gespült und in frischem Medium bis zur Ernte weiterkultiviert. Kontrollzellen wurden für insgesamt 12 min unter Lichtausschluss mit der Ro19-8022 Lösung inkubiert, bzw. nur in 1x PBS analog zu den Ro19-8022 behandelten Proben bestrahlt. Die Über-Nacht-Inkubation von MCF7 Zellen unter Bedingungen leichter Hypoxie (1% Sauerstoff), erfolgte in einer „Hypoxia Workstation Invivo-2-400“ (IUL Germany GmbH by Ruskin Technology Limited, Leeds, UK) in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Marxsen aus Lübeck.

### 3.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Als sensitiver Standardtest zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in Lösung wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) angewandt. Dieser Proteinnachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie-brilliant-blue-G (BioRad, München) an Argininreste sowie in geringerem Maße an einige andere basische und aromatische Aminosäuren. Die Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes kann durch Absorptionsmessung bei

595 nm (Spektrophotometer UV-160A, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) detektiert werden. Bovines Serumalbumin (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) diente als Proteinstandard zur Erstellung einer Eichgerade. Um mögliche Einflüsse von Detergenzien auf die Messwerte auszugleichen, wurden jeder Probe der Eichgerade sowie der Referenzprobe entsprechende Volumina an Lysepuffer zugesetzt.

### 3.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen denaturierende, diskontinuierliche Gele zum Einsatz. Dem jeweiligen Experiment entsprechend wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) von 7,5% oder 10% mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 5x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese (Minigel-Twin; Biometra, Göttingen) erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel (ETRON-S Stromversorgungsgerät; Harnischmacher Labortechnik, Arnsberg).

#### **1x Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris-Base  
192 mM Glycin  
0,1% SDS

#### **5x Laemmli-Ladepuffer**

330 mM Tris/HCl pH 6,8  
713 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
50% Glycerol  
5% SDS  
Bromphenolblau

#### **Sammelgel**

5% Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1)  
125 mM Tris/HCl pH 6,8  
0,1% SDS  
0,05% APS  
0,1% TEMED

#### **Trenngel**

7,5% bzw. 10% Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1)  
375 mM Tris/HCl pH 8,8  
0,1% SDS  
0,1% APS  
0,04% TEMED

### 3.6. Western-Blot

Der Western-Blot (WB) wurde nach dem „Semi-Dry“ Verfahren durchgeführt. Dazu wurden das Polyacrylamidgel und die aktivierte Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore Immobilon-P, Roth, Karlsruhe) zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere in der Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell; BioRad, München) angeordnet. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA pro Gel für 1 h (Standard Power Pack P25; Biometra, Göttingen). Die Proteindetektion wurde durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern und anschließender Chemolumineszenzreaktion (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Freiburg) erreicht.

#### **1x Transferpuffer**

10% Methanol  
96 mM Glycin  
10 mM Tris-Base

#### **Waschpuffer 1 x CMF-PBST**

167 mM NaCl  
20,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,05% Tween 20

#### **ECL Detektionslösung**

100 mM Tris / HCl pH 8,5  
1,25 mM Luminol  
0,2 mM p-Coumarsiure  
0,012%  $\text{H}_2\text{O}_2$

### 3.7. Verwendete Antikörper

#### Primäre Antikörper

Zielprotein	Bezeichnung		Verdünnung im WB	Spezies	bezogen von:
humane Topoisomerase I (91 kD)	C21	monoklonal	1:5.000	Maus	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
humanes p53 (53 kD)	Ab-6	monoklonal	1:5.000	Maus	Oncogene, Darmstadt
murines p53 (53 kD)	Ab-3	monoklonal	1:500	Maus	Oncogene, Darmstadt
PARP 1 (113 kD)	Ab-2	monoklonal	1:1.000	Maus	Oncogene, Darmstadt
$\beta$ -Actin (42 kD)	AC-15	monoklonal	1:20.000	Maus	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
OGG1 (39 kD)	ab204	polyklonal	1:500	Kaninchen	Abcam, Cambridge
OGG1/2 (39 kD)	L-19	polyklonal	1:500	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
SUMO-1 (12 kD)	Ab-1	polyklonal	1:500	Kaninchen	Oncogene, Darmstadt
HIF-1 $\alpha$ (120 kD)	Clone 54	monoklonal	Kooperation mit Dr. Marxsen aus Lübeck.	Maus	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

#### Sekundäre Antikörper

	Konjugat		Verdünnung	Spezies	bezogen von:
anti-Maus	HRP	Affinitäts- gereinigt	1:2.500	Ziege	Promega GmbH, Mannheim
anti-Kaninchen	HRP			Ziege	
anti-Ziege	HRP			Esel	

### 3.8. ICT Assay

Der ICT Assay (*in vivo* complex of topoisomerase) stellt eine effiziente Methode zum Nachweis kovalenter Topoisomerase-DNA-Komplexe dar (Subramanian et al., 2001; Subramanian et al., 1995; Subramanian et al., 1998). Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen in 1% N-Lauroylsarkosin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) lysiert, was zur Denaturierung der Proteine und vollständigen Ablösung nicht kovalent an die DNA-assoziierten Proteine führt. Im Folgenden diente eine Ultrazentrifugation (Optima XL; Beckman-Coulter GmbH, Krefeld) im Cäsiumchlorid-Gradienten zur quantitativen Abtrennung der freien Proteine von der DNA-Fraktion. Der Gradient bestand dabei aus Cäsiumchlorid-Stufen (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) gleichen Volumens von 1,82 g/cm<sup>3</sup> (6,65 M), 1,72 g/cm<sup>3</sup> (5,8 M), 1,5 g/cm<sup>3</sup> (4,0 M) und 1,37 g/cm<sup>3</sup> (3,0 M) Dichte (in 1x TE Puffer) - wobei sich die Proteine bei 1,3 g/cm<sup>3</sup> und die DNA bei 1,7 g/cm<sup>3</sup> anordnen. Aufgrund des kovalenten Charakters der Enzym-DNA Bindung im Schnittkomplex, ist die Topoisomerase I in der DNA-Fraktion nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die

Ultrazentrifugation über Nacht (16-20 h) bei 20°C und  $\sim 165.000 \times g$  durchgeführt. Im Anschluss wurde der Gradient vom Boden ausgehend fraktioniert und die Viskosität der erhaltenen Fraktionen durch Ultraschallbehandlung (Sonifier Modell 250; Branson Ultrasonic S.A., Frankreich) reduziert. Anhand der Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm (Spectra Max 250; Molecular Devices GmbH, Ismaning) konnten die DNA-Konzentration und Reinheit der Fraktionen ermittelt werden. Fraktionen, die DNA mit hinreichender Reinheit enthielten ( $OD_{260 \text{ nm}}/OD_{280 \text{ nm}} \geq 1,8$ ) wurden vereinigt oder einzeln auf die Anwesenheit von Topoisomerase I analysiert. Dazu wurde eine festgelegte DNA-Menge im Dot-Blot Verfahren (SRC96D Minifold I; Schleicher & Schuell, Dassel) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran; Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen, die anschließend mit einem Topoisomerase I spezifischen Antikörper (C21, monoklonaler muriner Antikörper gegen humane Topoisomerase I; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) entwickelt werden konnte.

**1 x TE**

10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA

### 3.9. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der DNA-Degradation während der Apoptose wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde die DNA der im Zuge des ICT Assays erhaltenen Fraktionen in einem 1%igen Agarosegel (Agagel Mini und Maxi; Biometra, Göttingen) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) sichtbar gemacht.

**1 x TBE Laufpuffer**

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

### 3.10. Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen nach der Ernte in absolutem Ethanol fixiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Färbung der DNA konnte durch Inkubation mit einer Propidiumiodid (Fluka, Buchs SG, Schweiz) / RNase A (Quiagen GmbH, Hilden) Lösung für 30 min bei 37°C unter Lichtausschluss erreicht werden. Die Messung erfolgte an einem EPICS XL-MCL Durchflusszytometer (Beckman-Coulter, Krefeld). Es wurden jeweils etwa 10.000 Zellen analysiert. Die Darstellung der Zellzyklusverteilung erfolgte in Form eines Balkendiagramms. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus jeweils mindestens drei Messwerten gebildet. Andernfalls wurden die Messwerte der direkt dem Western-Blot und Dot-Blot entsprechenden Proben gezeigt.

**Färbelösung in 1 x PBS**

40 µg/ml Propidiumiodid

250 µg/ml RNaseA



### 3.11. Dead Cell Removal Kit

Zur Separation von vitalen und apoptotischen Zellen einer Population wurde der „Dead Cell Removal Kit“ benutzt (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Als Selektionsmarker dient hierbei das Membranlipid Phosphatidylserin, welches im Gegensatz zu vitalen Zellen in apoptotischen Zellen auf der Außenseite der Zellmembran lokalisiert ist. Über die spezifische Bindung des Phosphatidylserins wurden zunächst speziell beschichtete magnetische Partikel an die apoptotischen Zellen gekoppelt. Diese konnten anschließend mit Hilfe eines Magneten in einer Säule zurückgehalten und somit von den vitalen Zellen der Population abgetrennt werden. Die qualitative Separation wurde durch eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau überprüft.

#### **1 x dead cell removal Puffer**

10 mM HEPES

150 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

### 3.12. alamarBlue™-Assay

Durch Inkubation von lebenden Zellen mit dem Farbstoff alamarBlue™ (BioSource, Nivelles, Belgien) können Wachstum und Vitalität einer Zellpopulation verfolgt werden. Die Bildung von Reduktionsäquivalenten während des Wachstumsprozesses führt dabei zur Umwandlung des alamarBlue von seiner oxidierten in die reduzierte Form, was anhand eines Farbwechsels zu detektieren ist. Für einen Vitalitätstest wurde zunächst eine festgelegte Zellzahl in die Vertiefungen einer sterilen 96er Mikrotiterplatte ausgesät. Etwa 24 h später erfolgte die Behandlung der Zellen und die Zugabe von 10% (v/v) alamarBlue-Lösung in jede Vertiefung. Als Negativkontrolle diente eine Vertiefung mit Medium und alamarBlue ohne Zellen, als Leerwert eine Vertiefung nur mit Medium. Beginnend am nächsten Tag konnte die fortschreitende Umsetzung des Farbstoffes durch Absorptionsmessung bei 570 nm und 600 nm (Spectra Max 250; Molecular Devices GmbH, Ismaning) quantifiziert werden. Im Falle der TNF $\alpha$  Behandlung wurde die alamarBlue-Lösung jeweils 6 h vor der Messung zugesetzt, da die Wirksamkeit der Substanz durch die Anwesenheit des Farbstoffes beeinträchtigt wird. Die Angabe des Zellwachstums erfolgt als Prozent des umgesetzten bzw. reduzierten Farbstoffes. Die Vitalität wird als „Prozent der metabolischen Aktivität der unbehandelten Kontrolle“ angegeben, wobei die Vitalität der Kontrolle zu 100% gesetzt wird. Zur Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden jeweils mindestens drei Messwerte herangezogen.

$$\% \text{ reduziertes alamarBlue} = \frac{(\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2}}{(\epsilon_{\text{red}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{red}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1}} \times 100$$

$$\% \text{ metabolische Aktivität} = \frac{(\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \text{ der behandelten Probe}}{(\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_2} A^*_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{ox}})_{\lambda_1} A^*_{\lambda_2} \text{ der Kontrollprobe}} \times 100$$

( $\epsilon$ red) $\lambda$ 1	155,677	molarer Extinktionskoeffizient des reduzierten alamarBlue bei 570 nm
( $\epsilon$ red) $\lambda$ 2	14,652	molarer Extinktionskoeffizient des reduzierten alamarBlue bei 600 nm
( $\epsilon$ ox) $\lambda$ 1	80,586	molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten alamarBlue bei 570 nm
( $\epsilon$ ox) $\lambda$ 2	117,216	molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten alamarBlue bei 600 nm
$A_{\lambda}1$		Messwert bei 570 nm
$A_{\lambda}2$		Messwert bei 600 nm
$A'_{\lambda}1$		Absorption der Negativkontrolle bei 570 nm
$A'_{\lambda}2$		Absorption der Negativkontrolle bei 600 nm

### 3.13. Stabile Transfektion

Für die stabile Transfektion der adhärennten Zellen wurden zunächst jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen in die Vertiefungen einer 24er Mikrotiterplatte ausgesät. Der Transfektionsansatz beinhaltete jeweils 1  $\mu$ g des Vektors sowie variierende Mengen an Transfektionsreagenz. Als Transfektionsagenzien wurden ExGen 500 (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) und Lipofectin® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Zur Generierung stabiler Zelllinien wurde das Medium 48 h nach Transfektion gegen antibiotikahaltiges Selektionsmedium ausgetauscht. Nicht transfizierte Zellen dienten zur Testung der Selektionsbedingungen und zur Kontrolle der Wirksamkeit des Selektionsantibiotikums. Die Zelllinien wurden anschließend unter permanentem Selektionsdruck kultiviert, wobei das Medium im Abstand von 3-4 Tagen gewechselt wurde. Nicht transfizierte Zellen waren durch die fehlende Antibiotikaresistenz nach etwa 10 Tagen vollständig abgestorben. Der Erfolg der Transfektion wurde zusätzlich im Western-Blot oder massenspektrometrisch überprüft.

Vektor Bezeichnung	Beschreibung	Vermittelte Resistenz	Selektionsbedingungen	Herkunft
pcDNA 3.1	Leervektor für OGG1-Transfektion	G418	600 $\mu$ g/ml in MEF OGG1 <sup>-/-</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pPR65	Vektor codiert für humanes OGG1	G418	600 $\mu$ g/ml in MEF OGG1 <sup>-/-</sup>	Prof. B. Epe, Universität Mainz (Hollenbach et al., 1999)

### 3.14. Chemikalien / Verbrauchsmaterialien

Die gesamten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, von folgenden Firmen in analysenreiner Qualität bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- E. Merck AG, Darmstadt

Die Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Ultrazentrifugenröhrchen von Beckman-Coulter GmbH, Krefeld

## 3.15. Geräte

<b>Beckman-Coulter GmbH;</b> Krefeld	Durchflusszytometer EPICS® XL-MCL
	Ultrazentrifuge Optima XL 100
	Rotoren SW40 Ti und SW60 Ti
<b>Bender und Hohbein;</b> Zürich, Schweiz	Vortex „Genie 2“
<b>Biometra;</b> Göttingen	Gelelektrophorese-Apparatur „Mini-Twin“
	Agagel „Maxi“ und „Mini“
	Standard Power Pack P25
<b>Biorad;</b> München	Power PAC 3000
	Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell
<b>Branson Ultrasonic S.A.;</b> France	Sonifier Modell 250
<b>Carl-Zeiss AG;</b> Jena	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135
<b>Eppendorf;</b> Hamburg	Tischzentrifuge „Centrifuge 5415C“
<b>Gibco BRL;</b> Karlsruhe	Agarosegelelektrophorese-Kammern:
	Horizon 58 & Horizon 11.14
<b>Gilson / ABIMED;</b> Langenfeld	Pipetten 2–1.000µl
<b>Haake;</b> Karlsruhe	Wasserbad DC1
<b>Harnischmacher Labortechnik;</b> Arnsberg	ETRON-S Power Supply
<b>Hettich;</b> Tuttlingen	Zentrifuge Rotina 48R & Rotanta 46RC
<b>HLC;</b> Bovenden	Blockthermostat BT 1301 und HTM 130 R
<b>Integra Biosciences;</b> Vancouver, Canada	Fireboy Eco
<b>IKA Labortechnik;</b> Staufen	Elektrorührer RCT basic
<b>neoLab Migge;</b> Heidelberg	Shaker DRS-12
<b>Nu Aire™;</b> Minnesota, USA	Zellkulturinkubatoren NuAire™ IR Autoflow
<b>Olympus Deutschland GmbH;</b> Hamburg	Lichtmikroskop CK2-TR
<b>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG;</b> Karlsruhe	pH-Meter 3150 (Jenway)
	Test Tube Thermostat TCR 100
<b>Mettler Toledo GmbH;</b> Giessen	Feinwaage PC 200
<b>Sartorius;</b> Göttingen	Präzisionswaage MC Research RC 250 S
<b>Shimadzu Europa GmbH;</b> Duisburg	Spektrophotometer UV-160A
<b>Stratagene;</b> Amsterdam, Niederlande	Pico-Fuge™
	UV-Stratalinker 1800
<b>The Baker Company /Labotect;</b> Göttingen	Steril-Gard Biological Safety Cabinet (Class II Type A/B3)
<b>WTB Binder;</b> Tuttlingen	Inkubatoren 37°C
<b>Molecular Devices GmbH;</b> Ismaning	Spektrophotometer SpectraMax250
	SoftMax Pro Version 1.1
<b>Eastman Kodak Company;</b>	Kodak Image Station 2000R
New Haven CT, USA	Kodak 1D Image Analysis Software

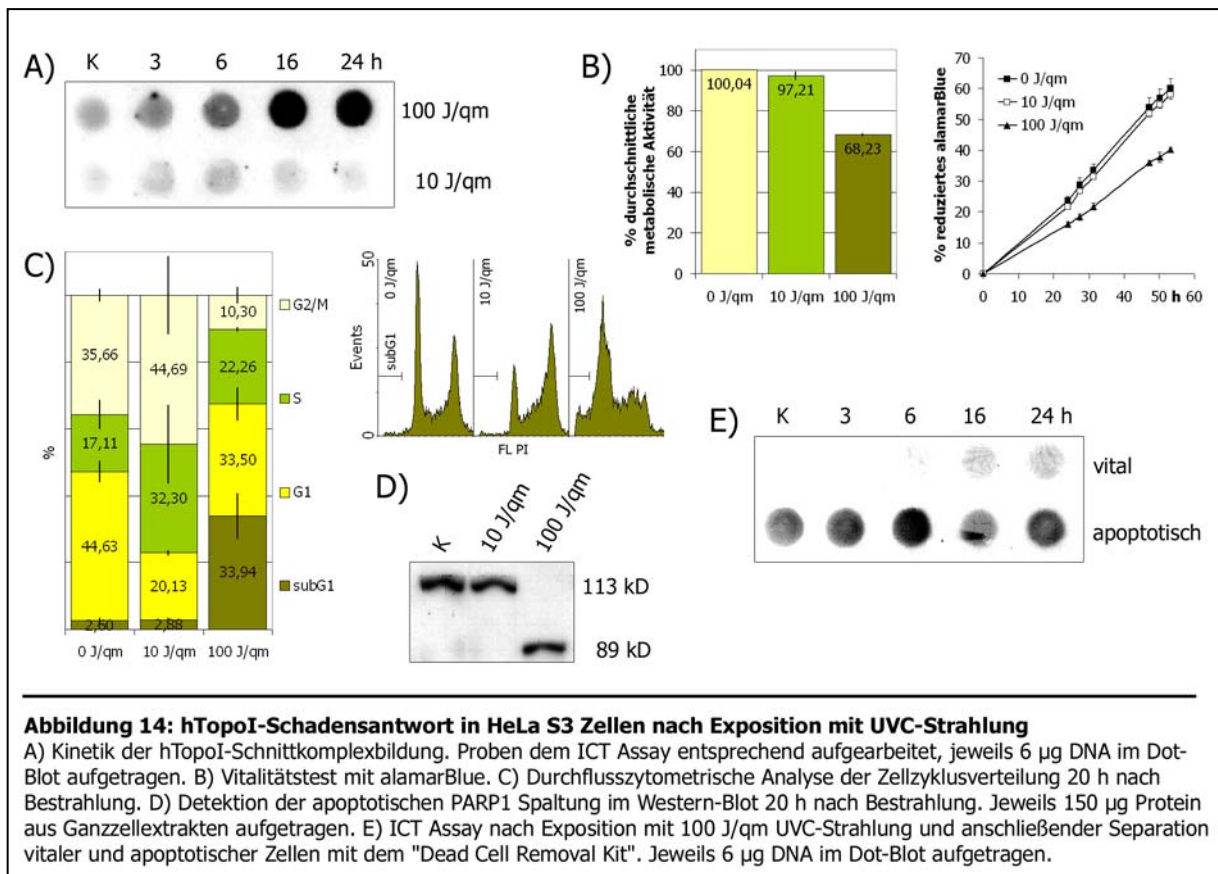
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Induktion einer hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit UVC-Strahlung

Eine der ersten Untersuchungen bei der eine hTopoI-Schadensantwort gezeigt wurde, erfolgte in adhärenenten HeLa Zellen nach Exposition mit UVB-Strahlung (Subramanian *et al.*, 1998). Es wurde nachgewiesen, dass diese Reaktion spezifisch hTopoI und nicht hTopoII auf der DNA arretiert. Dabei konnte eine dosisabhängige Zunahme der Bildung stabilisierter Schnittkomplexe bis 5 h nach Bestrahlung detektiert werden. Diese Ergebnisse dienten als Ausgangspunkt einer genaueren Untersuchung der Langzeitkinetik der hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit UVC-Strahlung. Als Modellsysteme wurden HeLa S3 Cervixkarzinomzellen sowie die humane Mammakarzinomzelllinie MCF7 verwendet. Der Nachweis kovalent auf der zellulären DNA gebundener Topoisomerasemoleküle konnte mit Hilfe des ICT Assays (siehe Methoden S.27) realisiert werden. Hierbei wurde die DNA-Fraktion des Zelllysates vom freien Protein durch eine Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten abgetrennt. Da die Bindung zwischen hTopoI und der DNA im Schnittkomplex kovalenter Natur ist, konnte die hTopoI mittels spezifischer Antikörper in der DNA-Fraktion detektiert werden.

Die Bestrahlung mit 10 und 100 J/qm UVC-Licht induzierte in beiden Zelllinien die Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe, die deutlich über dem Niveau der Kontrollzellen liegt (Abbildung 14 A und 15 A). Die detektierte hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit der hohen Strahlungsdosis zeigte in den HeLa S3 Zellen eine zunehmende Akkumulation von Schnittkomplexen bis 24 h nach Behandlung (Abbildung 14 A). Dieses Ergebnis unterstützt die Daten von Subramanian *et al.*, die ebenfalls eine Zunahme der hTopoI-Schnittkomplexbildung während der ersten 5 h beschrieben. Im Gegensatz dazu konnte bei Bestrahlung mit nur 10 J/qm nach einer Zunahme der Schnittkomplexbildung in den ersten Stunden, eine erneute Abnahme der Schnittkomplexe bis 24 h nach Behandlung nachgewiesen werden. Dabei war ein Rückgang der Anzahl an Schnittkomplexen bis auf das Niveau der Kontrollzellen zu beobachten. Auch insgesamt war die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen weniger stark ausgeprägt als nach Exposition mit der hohen Strahlungsdosis. Demzufolge scheint die Zelle bei einem geringen Ausmaß an DNA-Schädigung die auftretenden Schnittkomplexe entfernen zu können, während bei einem hohen Schadensmaß eine stärkere und permanente Antwort erfolgt.

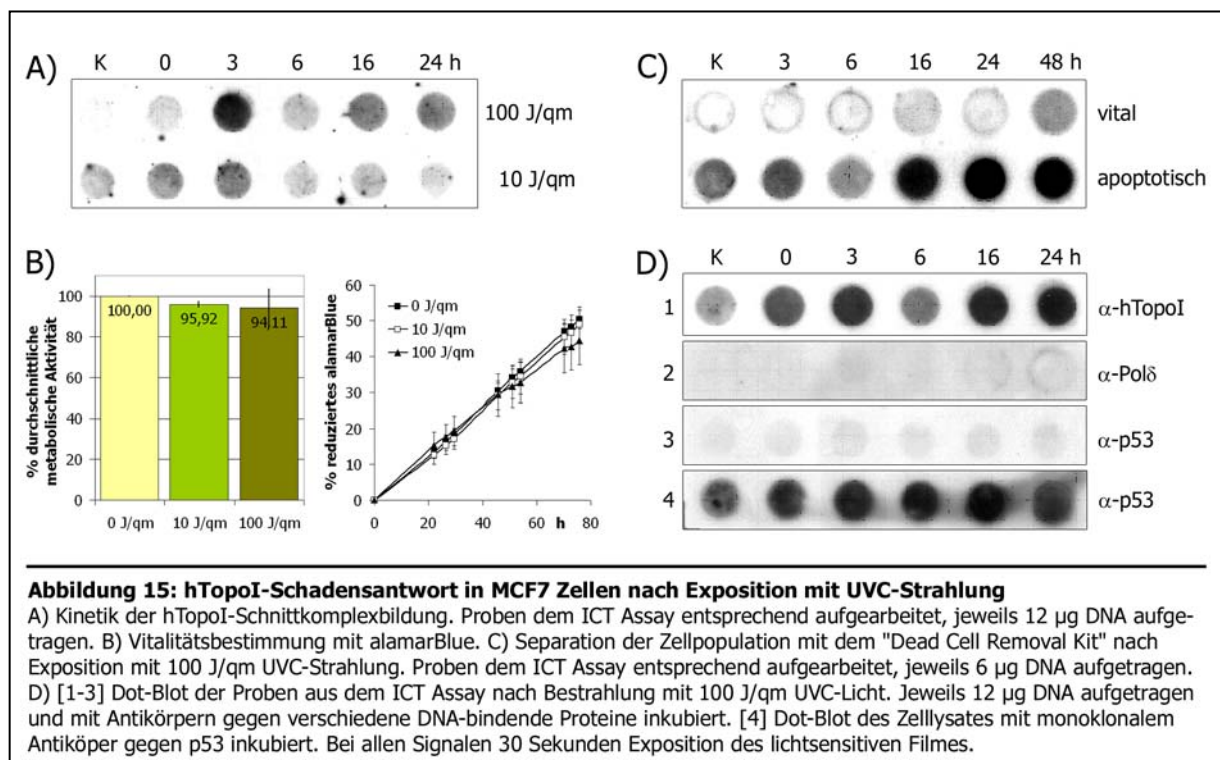
Interessant war nun zu überprüfen, ob diese Beobachtung mit einer veränderten Zellvitalität nach Exposition mit verschiedenen Strahlungsdosen in Zusammenhang steht. Die Zellvitalitätsmessung mit Hilfe des Farbstoffes alamarBlue (Methoden S.29) zeigte eine Verminderung der durchschnittlichen metabolischen Aktivität der Zellpopulation in Abhängigkeit der Strahlungsdosis (Abbildung 14 B). Die Wachstumskurve nach Exposition mit 100 J/qm, die anhand des Prozentsatzes an reduziertem alamarBlue erstellt werden kann, wies einen deutlich geringeren Anstieg im Vergleich zur Kontrolle auf. Im Gegensatz dazu unterschied sich das



Wachstum der mit 10 J/qm bestrahlten Population nur geringfügig von dem der unbestrahlten Kontrolle. Anhand eines Western-Blots konnte die deutlich verringerte metabolische Aktivität der stark bestrahlten Zellen mit der Induktion des programmierten Zelltodes in Zusammenhang gebracht werden. Dabei wurde die charakteristische Spaltung von PARP1 als Apoptosemarker in HeLa S3 Zellen detektiert (Abbildung 14 D) (Kaufmann et al., 1993; Shah et al., 1996). Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse, die eine deutliche Erhöhung der Anzahl an hypodiploiden/subG1 Zellen zeigt, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Abbildung 14 C). Hypodiploide Zellen treten bei der durchflusszytometrischen Analyse Propidiumiodid-gefärbter Proben in Form eines subG1 Signals in Erscheinung; also in Form einer zusätzlichen Spitze im Histogramm, die vor den G1 Zellen lokalisiert ist. SubG1 Zellen besitzen demzufolge einen geringeren DNA-Gehalt als Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Sie entstehen vor allem dadurch, dass die stark fragmentierte DNA fortgeschritten apoptotischer Zellen aus der im Zuge des Fixierungsprozesses permeabilisierten Zelle austreten kann. Die Detektion hypodiploider Zellen kann demzufolge als Apoptosemarker verwendet werden (Nicoletti et al., 1991; Zamai et al., 1993). Anhand dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass eine UVC-Strahlungsdosis von 100 J/qm in HeLa S3 Zellen Apoptose auslöst. Um zu belegen, dass das stark erhöhte hTopoI-Schnittkomplexsignal tatsächlich aus den apoptotischen Zellen resultierte, wurde die bestrahlte Zellpopulation mit Hilfe des „Dead Cell Removal Kits“ (Methoden S.29) in sterbende und vitale Zellen getrennt. Der sich anschließende ICT Assay belegte eine verstärkte Akkumulation von Schnittkomplexen in der apoptotischen Fraktion (Abbildung 14 E). Im Gegensatz dazu war in den vitalen Zellen nur ein geringes Komplexniveau nachweisbar.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass in nur schwach geschädigten Zellen eine transiente hTopoI-Schadensantwort mit einem niedrigen Schnittkomplexniveau nach Bestrahlung zu beobachten ist. Demgegenüber wird in Zellen, die nach Exposition einer hohen UVC-Strahlungsdosis den apoptotischen Zelltod eingeleitet haben, eine wesentlich stärkere und permanentere Schnittkomplexbildung induziert.

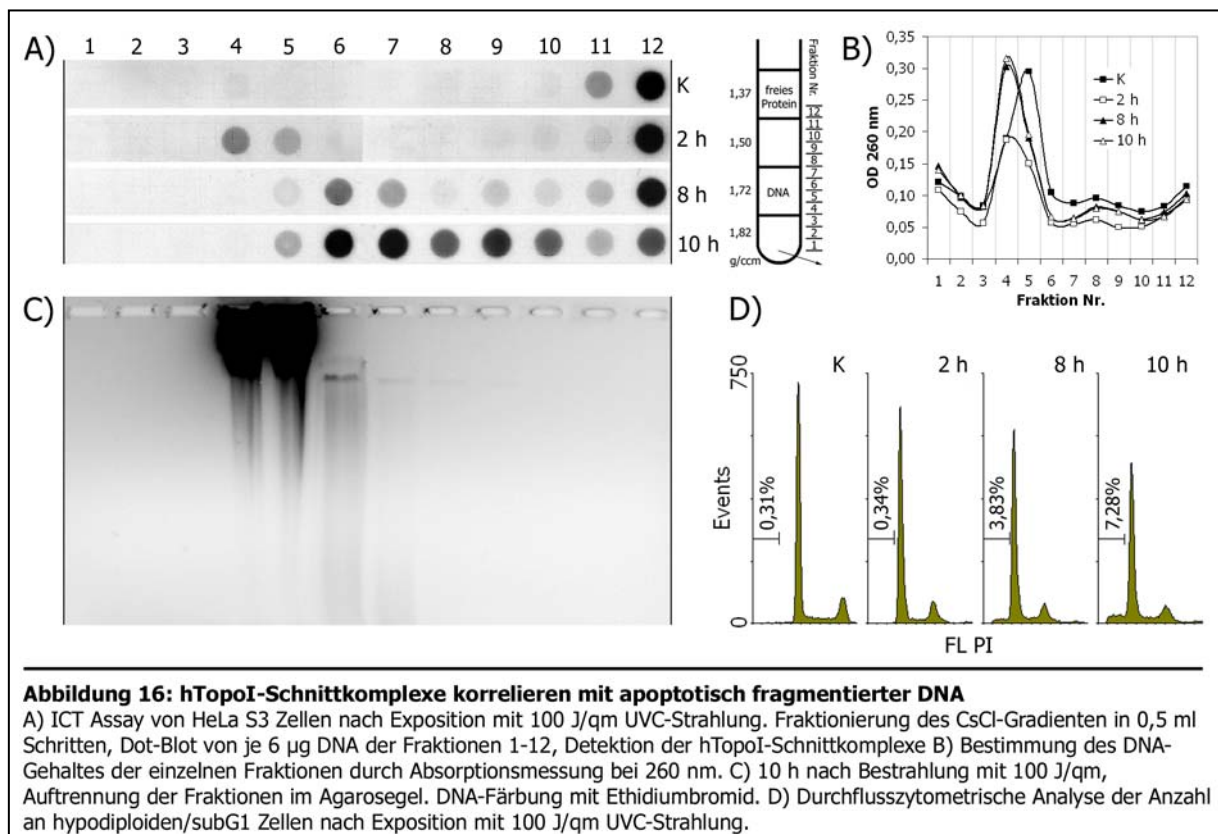
Eine ähnliche hTopoI-Schadensantwort konnte auch in MCF7 Zellen nach Exposition mit UVC-Strahlung beobachtet werden (Abbildung 15 A). Allerdings war hier der Unterschied im Schnittkomplexniveau zwischen den mit 10 J/qm und 100 J/qm bestrahlten Zellen geringer als bei den HeLa S3 Zellen. Erklärbar wäre dies mit der ebenfalls geringeren Apoptoseinduktion durch die hohe Strahlungsdosis. Die durchschnittliche metabolische Aktivität der mit 100 J/qm UVC-Strahlung exponierten Zellpopulation betrug noch rund 94% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15 B). Gleichbehandelte HeLa S3 Zellen besaßen unter diesen Bedingungen nur noch 68% Vitalität (Abbildung 14 B). Dementsprechend scheinen die MCF7 Zellen resistenter gegenüber UVC-Strahlung zu sein. Trotzdem konnte nach Trennung der bestrahlten Zellpopulation ein deutlich erhöhtes Schnittkomplexniveau in der apoptotischen Fraktion detektiert werden (Abbildung 15 C). Um sicherzustellen, dass die kovalenten hTopoI-Komplexe nicht durch unspezifisches Crosslinken verursacht werden, wurden die ICT Proben auf die Anwesenheit weiterer DNA-bindender Proteine untersucht (Abbildung 15 D1-3). Selbst nach einer Expositionszeit, bei der das relativ schwache hTopoI-Signal bereits überbelichtet ist, konnten Polymerase  $\delta$  und p53 nicht nachgewiesen werden, was ein unspezifisches Crosslinken von DNA-bindenden Proteinen durch die UVC-Strahlung unwahrscheinlich macht. Als Positivkontrolle wurden ansteigende Mengen Rohextrakt auf den Dot-Blot aufgetragen, wobei ein deutliches p53-Signal ersichtlich ist (Abbildung 15 D4).





#### 4.2. hTopoI-Schnittkomplexe korrelieren mit apoptotisch fragmentierter DNA

Ein charakteristisches Kennzeichen der fortgeschrittenen Apoptose ist die Degradation der zellulären DNA. Zur genaueren Analyse der Verteilung der hTopoI-Schnittkomplexe auf der DNA apoptotischer Zellen wurde der CsCl-Gradient des Ganzzelllysates bestrahlter HeLa S3 Zellen (100 J/qm) in 0,5 ml Schritten fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen konnten nun einzeln im Agarosegel bzw. im Dot-Blot analysiert werden. Gemäß der schematischen Darstellung des Gradienten in **Abbildung 16 A**, sollte die DNA in den Fraktionen 4 – 7 lokalisiert sein, während freies Protein erst ab Fraktion 12 zu finden sein dürfte. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes durch Absorptionsmessung bei 260 nm zeigte wie erwartet ein deutliches Maximum in den Fraktionen 4 und 5 (**Abbildung 16 B**). Auch im Agarosegel war der Großteil der hochmolekularen zellulären DNA in diesen Fraktionen zu detektieren (**Abbildung 16 C**). Im Dot-Blot der Kontrollzellen konnte in den Fraktionen 4 und 5 jedoch kaum hTopoI nachgewiesen werden (**Abbildung 16 A**). Dies korreliert mit dem erwarteten sehr geringen Spiegel an hTopoI-Schnittkomplexen in unbehandelten Zellen. Hingegen ist in den Fraktionen 11 und 12 ein deutliches Signal zu erkennen, welches von nicht kovalent gebunden hTopoI-Molekülen verursacht wird. Das heißt, mit Hilfe der Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten wurde eine saubere Abtrennung der DNA-Fraktion von freiem Protein erreicht. Dieses Ergebnis trägt somit auch zur weiteren Validierung des ICT Assays als Methode zum Nachweis kovalent an die DNA gebundener hTopoI-Moleküle bei. Im Unterschied zu den Kontrollen wurde in den bestrahlten Zellen eine deutliche Schnittkomplexbildung induziert. Bereits 2 h nach Exposition mit UVC-Licht konnte eine Akkumulation von hTopoI in den Fraktionen 4 und 5 beobachtet werden, die mit dem DNA-



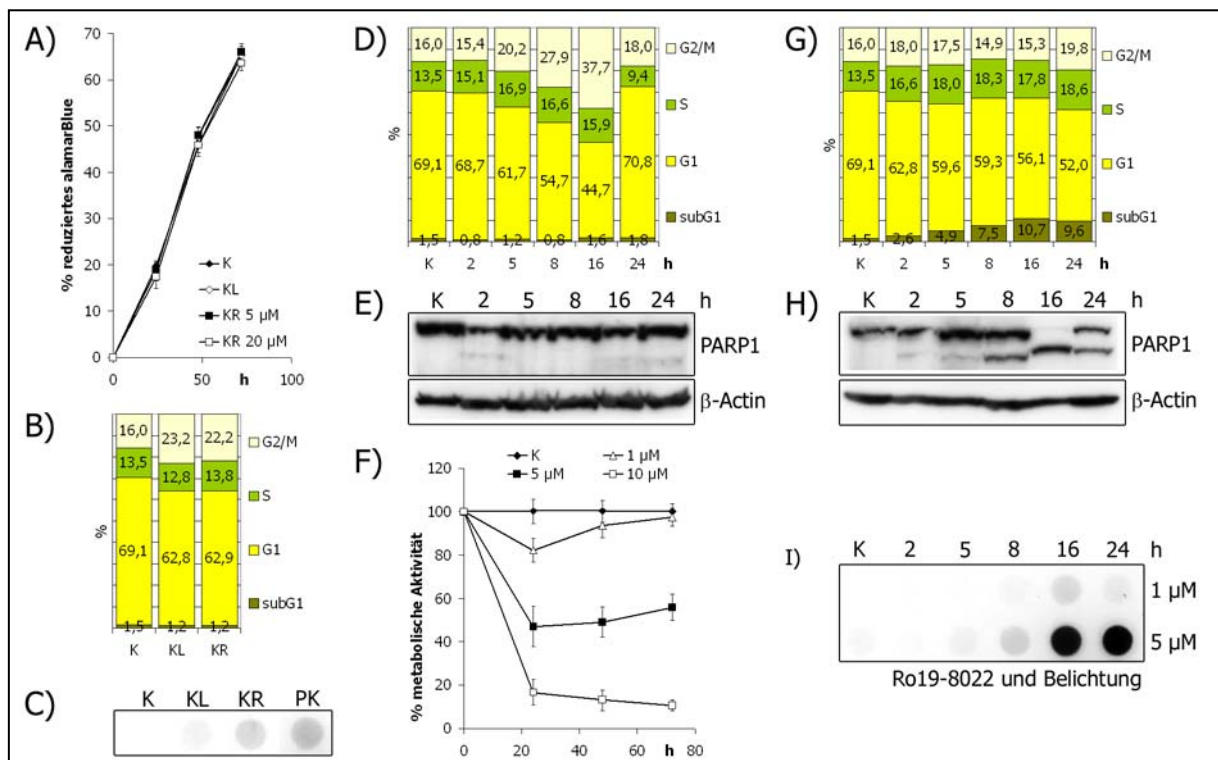
Maximum korreliert (vergleiche Abbildung 16 B). Zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung (8 h und 10 h) erfolgte eine signifikante Verstärkung der Schnittkomplexbildung. Überdies kann eine Verschiebung der Signale in die Fraktionen 6 und 7 beobachtet werden. Anhand des Agarosegels ist ersichtlich, dass die detektierten Schnittkomplexe 10 h nach Bestrahlung vor allem auf der fragmentierten DNA lokalisiert sind. Die apoptotische Degradation der zellulären DNA spiegelt sich auch im Anstieg der subG1 Zellpopulation zu diesem Zeitpunkt wider (Abbildung 16 D). Die bevorzugte Lokalisierung der hTopoI-Schnittkomplexe auf der fragmentierten DNA ist ein weiterer Hinweis für einen potentiellen Zusammenhang zwischen der hTopoI-Schadensantwort und der Apoptose.

#### 4.3. Kinetik der hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Induktion oxidativer DNA-Schäden

Eine im Gegensatz zur UVC-Strahlung physiologisch relevante Art der DNA-Schädigung stellt die Exposition mit reaktiven Sauerstoffspezies dar. Oxidative DNA-Schäden entstehen in der Zelle permanent durch reaktive Intermediate des aeroben Stoffwechsels und können zusätzlich durch exogene Faktoren vermehrt werden. Eine hoch mutagene oxidative Basenläsion stellt das 7,8-Dihydro-8oxoGuanin (8oxoG) dar (Einleitung S.19). Im Zellkultursystem kann diese oxidative Schädigung durch die Inkubation mit der photoreaktiven Substanz Ro19-8022 bei gleichzeitiger Exposition mit starkem Licht induziert werden (Methoden S.25) (Will et al., 1999). Um sicherzustellen, dass detektierte hTopoI-Schnittkomplexe weder durch die Behandlung mit Ro19-8022 alleine, noch nach Exposition mit Licht ohne die photoreaktive Substanz entstehen, wurden die entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Der Vitalitätstest mit alamarBlue zeigte ein vergleichbares Wachstum von Zellpopulationen die entweder ohne Exposition mit der reaktiven Substanz (KL) bzw. ohne Bestrahlung (KR) oder vollständig unbehandelt (K) kultiviert wurden (Abbildung 17 A). Selbst die Inkubation mit sehr hohen Konzentrationen von Ro19-8022 (KR 20  $\mu$ M) beeinflusste ohne gleichzeitige Lichtexposition das Wachstum der Zellen nicht. Entsprechend konnte in der durchflusszytometrischen Analyse keine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen detektiert werden (Abbildung 17 B). Auch die Verteilung der Zellen im Zellzyklus wurde nur minimal beeinflusst. Folglich ist auch keine signifikante Induktion einer hTopoI-Schadensantwort in den Kontrollproben K, KL und KR zu beobachten (Abbildung 15 C). Als Positivkontrolle (PK) ist zusätzlich das Signal einer Probe 16 h nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Ro19-8022 unter Belichtung gezeigt (vergleiche Abbildung 17 I). Diese Behandlung induzierte eine schwache, aber reproduzierbare hTopoI-Schadensantwort. Demzufolge konnte belegt werden, dass weder die photoreaktive Substanz, noch die Belichtung, eine detektierbare Schädigung der Zellen hervorrufen, sofern sie unabhängig voneinander verabreicht werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Verringerung der metabolischen Aktivität nach Behandlung mit verschiedenen Ro19-8022 Konzentrationen und gleichzeitiger Belichtung (Abbildung 17 F). Dieser Einfluss auf die Zellvitalität sollte eine Folge der induzierten oxidativen DNA-Schädigung sein. Die vorübergehende Verringerung der metabolischen Aktivität etwa 20 h nach Behandlung



mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und Belichtung, geht mit einem G2/M-Arrest im Zellzyklus einher (vergleiche Abbildung 17 F und D). Da in dieser Probe keine erhöhte Anzahl hypodiploider/subG1 Zellen und auch keine apoptotische Degradation von PARP1 zu beobachten war (Abbildung 17 D und E), charakterisiert dies wahrscheinlich die Reparaturphase der induzierten oxidativen DNA-Schäden. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  Ro-19-8022 etwa 68 8oxoGs pro  $10^6$  Basenpaare in HeLa Zellen induziert (Pflaum et al., 1997). Dabei wurde allerdings eine höhere Strahlungs-dosis (675 kJ/qm bei 400-800 nm) als bei den vorliegenden Experimenten (111 kJ/qm bei 400-800 nm) verwendet. Analog zu den Beobachtungen nach Exposition mit der geringen UVC-Strahlungs-dosis (Abbildungen 14 A und 15 A) war auch bei leichtem oxidativen Stress nur eine transiente hTopoI-Schadensantwort zu detektieren (Abbildung 17 I, 1  $\mu\text{M}$ ). Demgegenüber konnte eine wesentlich stärkere und langlebigere Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen bei Exposition mit 5  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und gleichzeitiger Belichtung nachgewiesen werden. Diese geht mit einer Erhöhung der Anzahl hypodiploider/subG1 Zellen einher, was ein deutliches Zeichen für Apoptose darstellt (Abbildung 17 G). Die charakteristische Abbaubande von PARP1 ist ab 5 h nach Behandlung ebenfalls nachweisbar (Abbildung 17 H). Auch im alamarBlue-Test konnte eine Verminderung der metabolischen Aktivität um etwa 50% beobachtet werden (Abbildung 17 F). Zusammenfassend konnte nach Induktion oxidativer DNA-



**Abbildung 17: hTopoI-Schadensantwort in HeLa S3 Zellen nach Einführung oxidativer DNA Schäden**

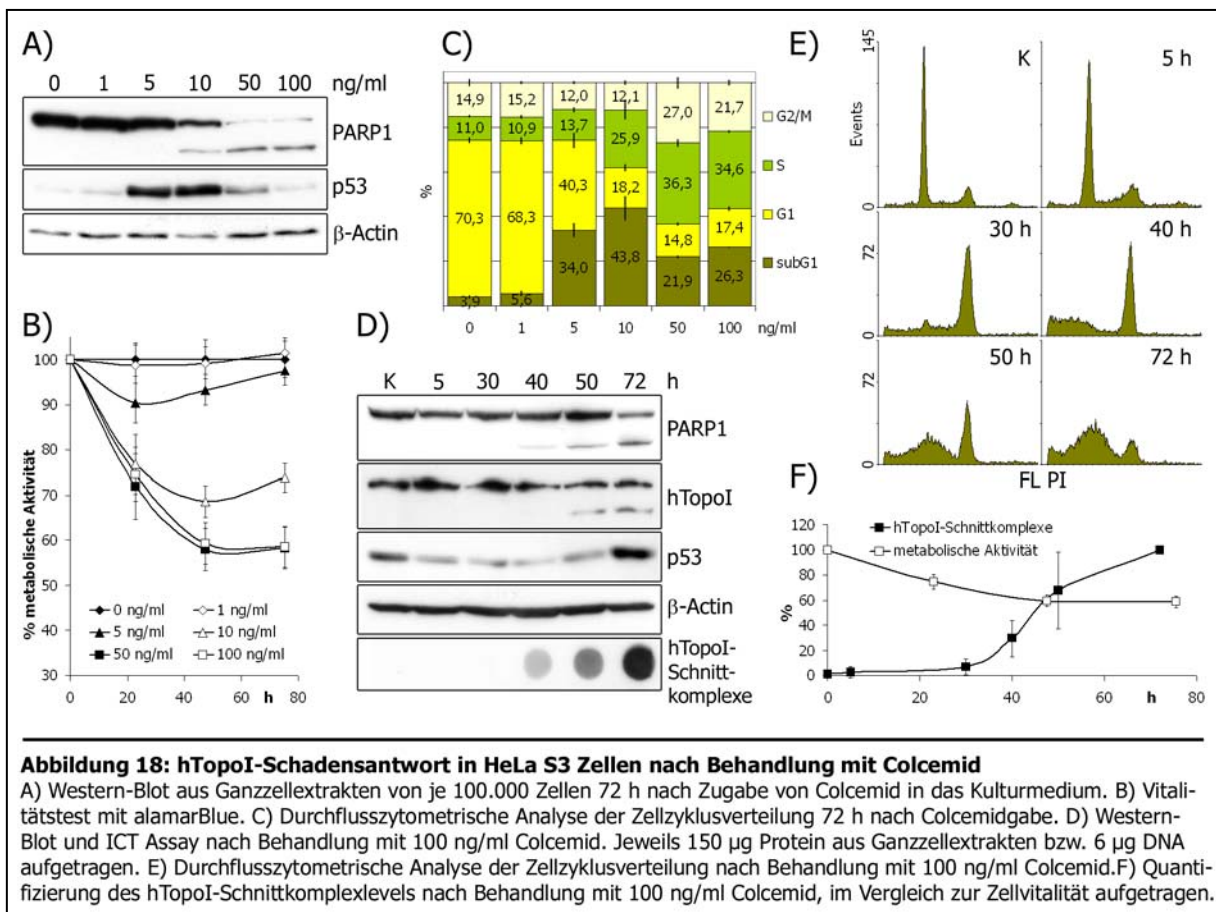
A) Wachstumskurven nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der photoreaktiven Substanz Ro19-8022 ohne Belichtung (KR) bzw. nur nach Exposition mit Licht in Abwesenheit von Ro19-8022 (KL) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). B) Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung in unbehandelten (K), nur belichteten (KL) und nur mit Ro19-8022 unter Lichtausschluss (KR) behandelten Proben. C) ICT Assay zum Nachweis der hTopoI-Schnittkomplexe, je 6  $\mu\text{g}$  DNA aufgetragen. Als Positivkontrolle (PK) Probe 16 h; 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 aus Abb. I aufgetragen. D) Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung nach Exposition mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und Belichtung. E) Nachweis von PARP1 im Western-Blot nach Exposition der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und Belichtung. Ganzzelllysate von je 100.000 Zellen auf das Gel aufgetragen. F) Metabolische Aktivität nach Behandlung mit verschiedenen Ro19-8022 Konzentrationen unter Belichtung. G) Durchflusszytometrie analog zu D, mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Ro19-8022. H) Western-Blot analog zu E, mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Ro19-8022. I) Nachweis der hTopoI-Schnittkomplexe im ICT Assay. Jeweils 6  $\mu\text{g}$  DNA aufgetragen.

Läsionen eine hTopoI-Schadensantwort detektiert werden, deren Ausprägung vom Ausmaß der Schädigung abhängig zu sein scheint. Ein DNA-Schadenslevel, das von zellulären Reparaturmechanismen bewältigt werden kann, führt dabei zur transienten Bildung einer leicht erhöhten Anzahl an hTopoI-Schnittkomplexen. Demgegenüber wird eine starke hTopoI-Schadensantwort induziert, wenn das Schadensmaß die zelluläre Reparaturkapazität überschreitet und der apoptotische Zelltod eingeleitet wird.

#### 4.4. Induktion einer hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit Colcemid

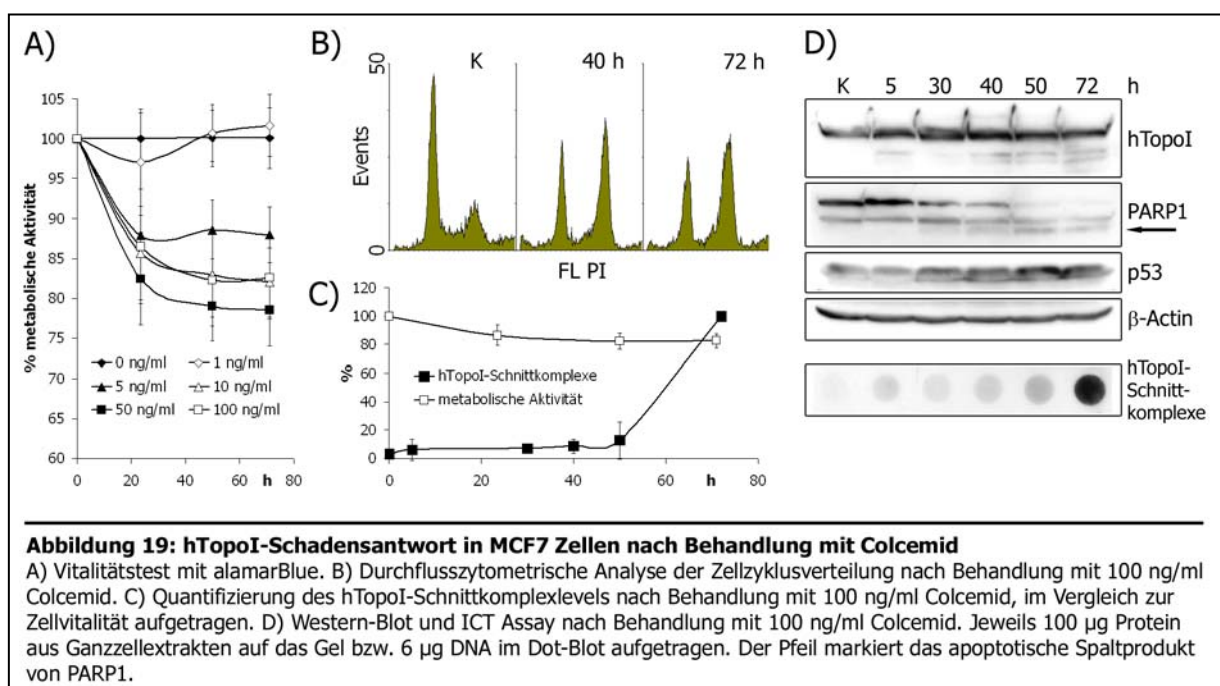
Anhand der vorangegangenen Experimente deutet sich ein Zusammenhang zwischen der hTopoI-Schadensantwort und der Einleitung des programmierten Zelltodes an. Bei der Untersuchung der nach apoptotischen und vitalen Zellen getrennten Population war zudem auffällig, dass auch im apoptotischen Anteil der nicht bestrahlten Kontrollzellen ein deutliches Schnittkomplexsignal nachweisbar war (Abbildungen 14 E auf S.34 und 15 C auf S.35). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass eine vermehrte Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen ein generelles Merkmal sterbender Zellen sein könnte. Deshalb wurde in einer weiteren Versuchsreihe ein anderer Apoptosestimulus eingesetzt, um die hTopoI-Schadensantwort zu induzieren. Alle bis zu diesem Zeitpunkt aus der Literatur bekannten Induktoren von hTopoI-Schnittkomplexen waren DNA-schädigende Agenzien (Pommier et al., 2000a; Pourquier et al., 2002; Pourquier et al., 2000; Pourquier et al., 2001; Rosenstein et al., 1997; Subramanian et al., 1998). Begründet war dies in dem bis dahin postulierten Mechanismus der Arretierung des kovalenten hTopoI-Komplexes, der den DNA-Schaden selbst als Ursache voraussetzte. Um zu analysieren, ob nur bei der durch DNA-Schäden induzierten Apoptose eine hTopoI-Schadensantwort eingeleitet wird, wurden Zellen mit Colcemid behandelt. Colcemid gehört zur Gruppe der Mikrotubuli-interferierenden Agenzien, wobei es die Bildung polymerer Mikrotubuli verhindert. Entsprechend wird die Apoptose über die Aktivierung eines Zellzykluskontrollpunktes ausgelöst, der die inkorrekte Assemblierung der Kernspindel während der Mitose detektiert (Mollinedo and Gajate, 2003). Zunächst wurde die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Induktion des programmierten Zelltodes nach Behandlung mit Colcemid untersucht. Da die Wirkung der Substanz erst während der Mitose zum Tragen kommt sind relativ lange Expositionszeiten notwendig.

72 h nach Zugabe von Colcemid in das Kulturmedium war eine deutliche apoptotische Spaltung von PARP1 ab einer Konzentration von 10 ng/ml zu beobachten (Abbildung 18 A). Eine erhöhte Anzahl hypodiploider/subG1 Zellen konnte bereits ab 5 ng/ml detektiert werden (Abbildung 18 C). Die Behandlung mit einer Colcemidkonzentration von 1 ng/ml scheint auch nach 72-stündiger Exposition keine Apoptose zu induzieren. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch den Vitalitätstest mit alamarBlue (Abbildung 18 B), bei dem die gemessene metabolische Aktivität der mit 1 ng/ml Colcemid behandelten Zellen etwa der der Kontrollpopulation entsprach. Hingegen konnte eine signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität ab einer



Colcemidkonzentration von 10 ng/ml beobachtet werden. Colcemid ist dementsprechend in der Lage, dosis- und zeitabhängig Apoptose in HeLa S3 Zellen auszulösen. Bei der Untersuchung des Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Colcemid wurde festgestellt, dass Zellen unter einer Konzentration von 20 ng/ml eine aberrante Mitose durchführen können und erst als polyploide Zellen in der folgenden G1-Phase sterben (Sherwood et al., 1994). Um die Apoptose bereits in der Metaphase zu induzieren, sollte eine Konzentration ab 20 ng/ml verwendet werden. Bei Behandlung mit 100 ng/ml Colcemid konnte man nach 30 h zunächst einen deutlichen M-Phase Arrest beobachten (Abbildung 18 E). Etwa 40 h nach Colcemidgabe war eine starke Erhöhung der Anzahl hypodiploider/subG1 Zellen zu detektieren, was ein prominentes Kennzeichen der Apoptose darstellt. Nach 40 – 50 h konnte ebenfalls ein deutlicher apoptotischer Abbau von PARP1 und hTopoI gezeigt werden (Abbildung 18 D). Gleichzeitig ist eine Erhöhung des p53-Proteingehaltes ersichtlich. Obwohl der Wirkungsmechanismus von Colcemid DNA-schadensunabhängig ist, konnte eine vermehrte hTopoI-Schnittkomplexbildung nachgewiesen werden. Diese korrelierte zeitlich mit der Induktion des programmierten Zelltodes, wie anhand der verschiedenen Apoptosemarker gezeigt. Für Abbildung 18 F wurden die detektierten hTopoI Signale quantifiziert, wobei das stärkste Signal bei 72 h 100% entspricht. Der Vergleich mit der metabolischen Aktivität, die zusätzlich im Diagramm aufgetragen wurde, verdeutlicht nochmals den inversen Zusammenhang zwischen Schnittkomplexbildung und Zellvitalität.

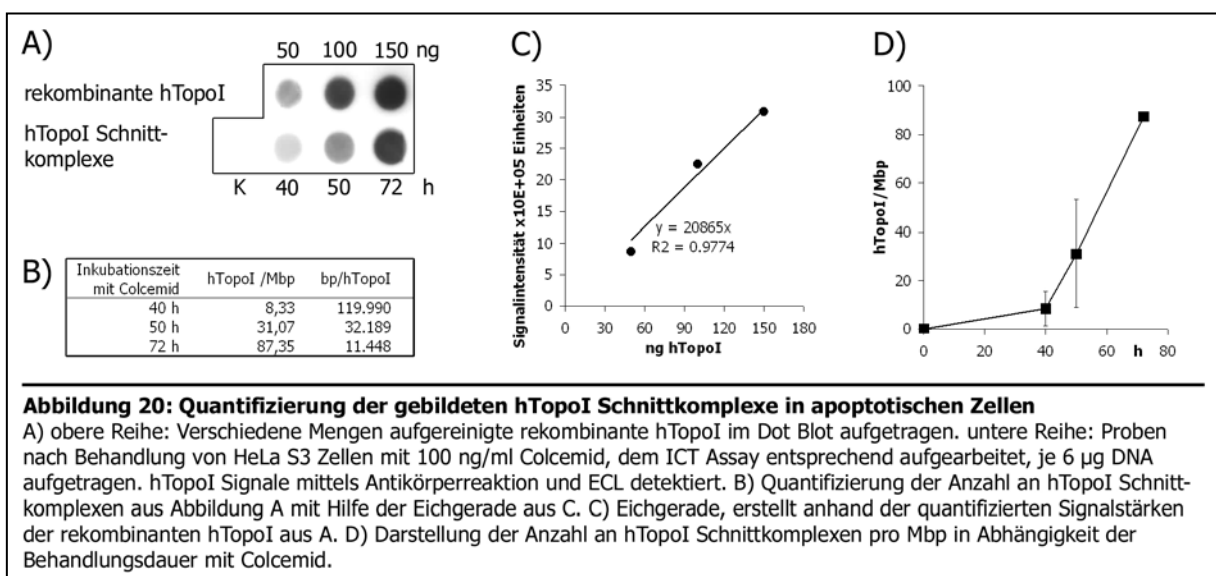
Analog zur Exposition mit UVC-Strahlung, scheinen die MCF7 Zellen auch bei Behandlung mit Colcemid resistenter als HeLa S3 Zellen zu sein. Dies wird als erstes im Vitalitätstest mit alamarBlue deutlich (vergleiche Abbildung 18 B und 19 A). Während in HeLa S3 Zellen 72 h nach Behandlung mit 100 ng/ml Colcemid die metabolische Aktivität nur noch etwa 59% im Vergleich zur Kontrollpopulation betrug, lag bei MCF7 Zellen die Vitalität bei 83%. Analog zu HeLa S3 konnte in der MCF7 Zelllinie nach 40 h Behandlung mit 100 ng/ml Colcemid eine deutliche Akkumulation von M-Phase Zellen beobachtet werden (Abbildung 19 B). Die für die Apoptose charakteristische Erhöhung der Anzahl an hypodiploiden/subG1 Zellen war 72 h nach Colcemidgabe jedoch nicht ersichtlich. Dies könnte, unterstützt durch die Ergebnisse der Vitalitätsmessung, mit der nur geringen Apoptoseinduktion begründet werden. Dementsprechend konnte nur eine schwache Bande des apoptotischen Spaltproduktes von hTopoI im Western-Blot detektiert werden (Abbildung 19 D). Andererseits ist jedoch bekannt, dass in MCF7 Zellen aufgrund einer Caspase 3-Defizienz keine oligonukleosomale DNA-Fragmentierung während der Apoptose stattfinden kann (siehe Einleitung S.22) (Jänicke et al., 1998; Wolf et al., 1999). Dies wirkt sich auch auf die Spaltung von hTopoI aus, die hauptsächlich durch Caspase 3 erfolgt (Samejima et al., 1999). PARP1 konnte im Gegensatz dazu als Substrat verschiedener Caspasen identifiziert werden (Huppertz et al., 1999). Folglich konnte im Western-Blot eine deutliche Abnahme der Intensität der Bande des vollständigen PARP1 Proteins beobachtet werden (Abbildung 19 D). Parallel zur Abnahme des PARP1 Signals war eine Zunahme der p53-Bande zu detektieren. Die vermehrte Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen ist im Vergleich zu den HeLa S3 Zellen verzögert und erfolgt erst 72 h nach Inkubation mit Colcemid sprunghaft (Abbildung 19 C und D). Bezugnehmend auf die Ergebnisse von Sordet *et al.* könnte dies ebenfalls auf das Fehlen der Caspase 3 zurückgeführt werden, der eine unterstützende Rolle bei der Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen zugesprochen wird (Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004c).





#### 4.5. Quantifizierung der induzierten hTopoI-Schnittkomplexe in apoptotischen Zellen

Um eine bessere Vorstellung davon zu bekommen, welchen Einfluss die verstärkte Arretierung von hTopoI-Molekülen auf der DNA im Zuge der Apoptose haben könnte, wurde die Anzahl der induzierten hTopoI-Schnittkomplexe quantifiziert. Zur Erstellung einer Eichgerade (Abbildung 20 C) wurden verschiedene Mengen aufgereinigte rekombinante hTopoI im Dot-Blot aufgetragen, mit einem monoklonalen Antikörper gegen hTopoI entwickelt (Abbildung 20 A obere Reihe) und die resultierenden Signalintensitäten gemessen. Auf den gleichen Dot-Blot wurden außerdem Proben (jeweils 6 µg DNA) eines ICT Assays von HeLa S3 Zellen nach Behandlung mit 100 ng/ml Colcemid aufgetragen (Abbildung 20 A untere Reihe). Die Bestimmung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe der Phoretix 1D Quantifizierungssoftware. Anhand der erstellten Eichgerade mit Hilfe des rekombinanten Proteins konnte die Menge hTopoI abgeschätzt werden, die im Zuge der Schadensantwort auf 6 µg DNA lokalisiert ist. Bei einer Molmasse von etwa 91 kD enthält 1 ng hTopoI etwa  $1,09 \times 10^{-14}$  mol hTopoI, also rund  $6,6 \times 10^9$  Topoisomerasemoleküle. Legt man für die weitere Berechnung eine durchschnittliche molare Masse von 307,95 g/mol pro Nukleotid zugrunde, entsprechen die aufgetragenen 6 µg DNA etwa einer Anzahl von  $1,17 \times 10^{16}$  Nukleotiden bzw. Nukleobasen. Für doppelsträngige DNA ergibt sich somit eine Länge von etwa  $0,58 \times 10^{16}$  Basenpaaren. Anhand dieser Werte konnte nun grob die durchschnittliche Anzahl an hTopoI-Schnittkomplexen pro Megabasenpaar (Mbp) abgeschätzt werden (Abbildung 20 B). Gleichzeitig lässt sich auch der durchschnittliche Abstand zwischen zwei hTopoI-Schnittkomplexen errechnen, wenn eine Gleichverteilung auf der DNA angenommen wird. In Abbildung 20 D ist die Anzahl an hTopoI-Schnittkomplexen pro Megabasenpaar in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Colcemid aufgetragen, wobei eine drastische Zunahme mit der Zeit zu beobachten ist. Nach 72 h Exposition mit Colcemid, also in fortgeschritten apoptotischen Zellen, können durchschnittlich 87 hTopoI-Schnittkomplexe pro Megabasenpaar detektiert werden.

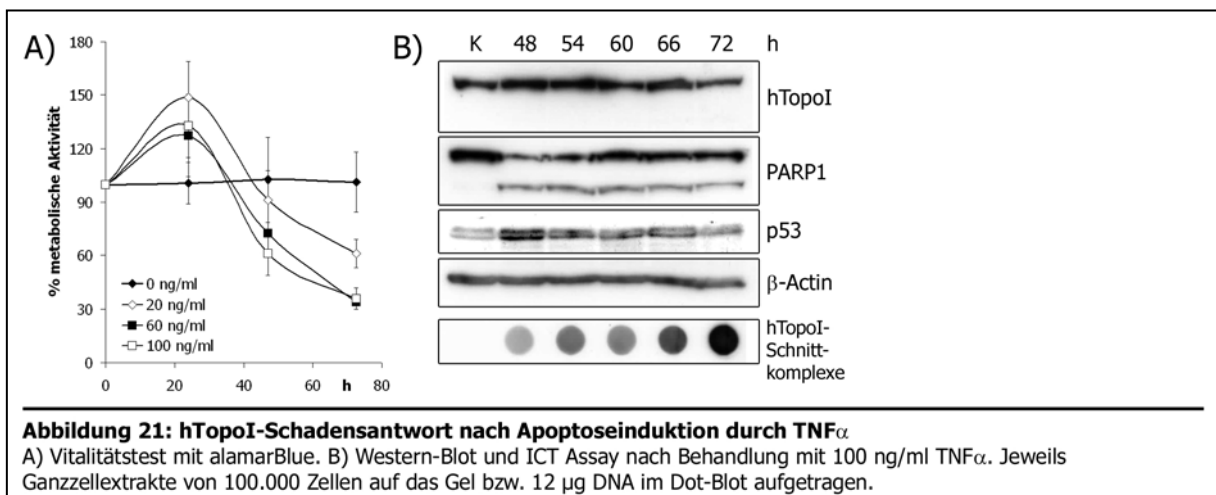


**Abbildung 20: Quantifizierung der gebildeten hTopoI Schnittkomplexe in apoptotischen Zellen**

A) obere Reihe: Verschiedene Mengen aufgereinigte rekombinante hTopoI im Dot Blot aufgetragen. untere Reihe: Proben nach Behandlung von HeLa S3 Zellen mit 100 ng/ml Colcemid, dem ICT Assay entsprechend aufgearbeitet, je 6 µg DNA aufgetragen. hTopoI Signale mittels Antikörperreaktion und ECL detektiert. B) Quantifizierung der Anzahl an hTopoI Schnittkomplexen aus Abbildung A mit Hilfe der Eichgerade aus C. C) Eichgerade, erstellt anhand der quantifizierten Signalstärken der rekombinanten hTopoI aus A. D) Darstellung der Anzahl an hTopoI Schnittkomplexen pro Mbp in Abhängigkeit der Behandlungsdauer mit Colcemid.

#### 4.6. hTopoI-Schadensantwort nach Apoptoseinduktion mit $\text{TNF}\alpha$

Der Nachweis einer hTopoI-Schadensantwort durch Behandlung mit Colcemid deutet bereits einen generellen Zusammenhang zur Apoptose an, der unabhängig von der Art des Apoptosestimulus ist. Eine weitere Möglichkeit, den programmierten Zelltod DNA-schadensunabhängig zu induzieren, ist die Auslösung des rezeptorvermittelten Weges. Zytokine, wie der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ), können durch Bindung an den entsprechenden membranständigen Rezeptor direkt die Caspasen-Kaskade aktivieren (Wajant et al., 2003). Da in HeLa S3 Zellen durch  $\text{TNF}\alpha$  Behandlung keine Apoptose induziert werden kann, mussten diese Untersuchungen auf die MCF7 Zelllinie beschränkt werden. Im alamarBlue-Assay zeigte sich ein deutlicher Einfluss der  $\text{TNF}\alpha$  Behandlung auf die Zellvitalität (Abbildung 21 A). Die anfängliche Steigerung der metabolischen Aktivität kann damit begründet werden, dass Vertreter der TNF Rezeptorfamilie auch in Signalwege zur Induktion von Zellwachstum und Proliferation eingebunden sind (Gaur and Aggarwal, 2003). MCF7 Zellen, die mit 100 ng/ml rekombinantem humanem  $\text{TNF}\alpha$  behandelt wurden, zeigten bereits nach 48 h eine deutliche Degradation von PARP1 sowie eine schwache Erhöhung des p53-Signals (Abbildung 21 B). Die für apoptotische Zellen typische Abbaubande von hTopoI konnte jedoch nicht detektiert werden. Eine Begründung hierfür könnte in der bereits erwähnten Caspase 3 Defizienz der MCF7 Zelllinie gefunden werden. Eine ansteigende Anzahl an hTopoI-Schnittkomplexen war analog zur PARP1 Spaltung ab 48 h nachzuweisen (Abbildung B, unterste Reihe). In Vorexperimenten konnte 24 h nach Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$  in das Kulturmedium noch keine signifikante Erhöhung des Schnittkomplexniveaus im Vergleich zur Kontrollprobe beobachtet werden. Zusammenfassend wird also die DNA-schadensunabhängige Apoptoseinduktion durch  $\text{TNF}\alpha$ , analog zur Behandlung mit Colcemid, von einer hTopoI-Schadensantwort begleitet.



#### 4.7. Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen

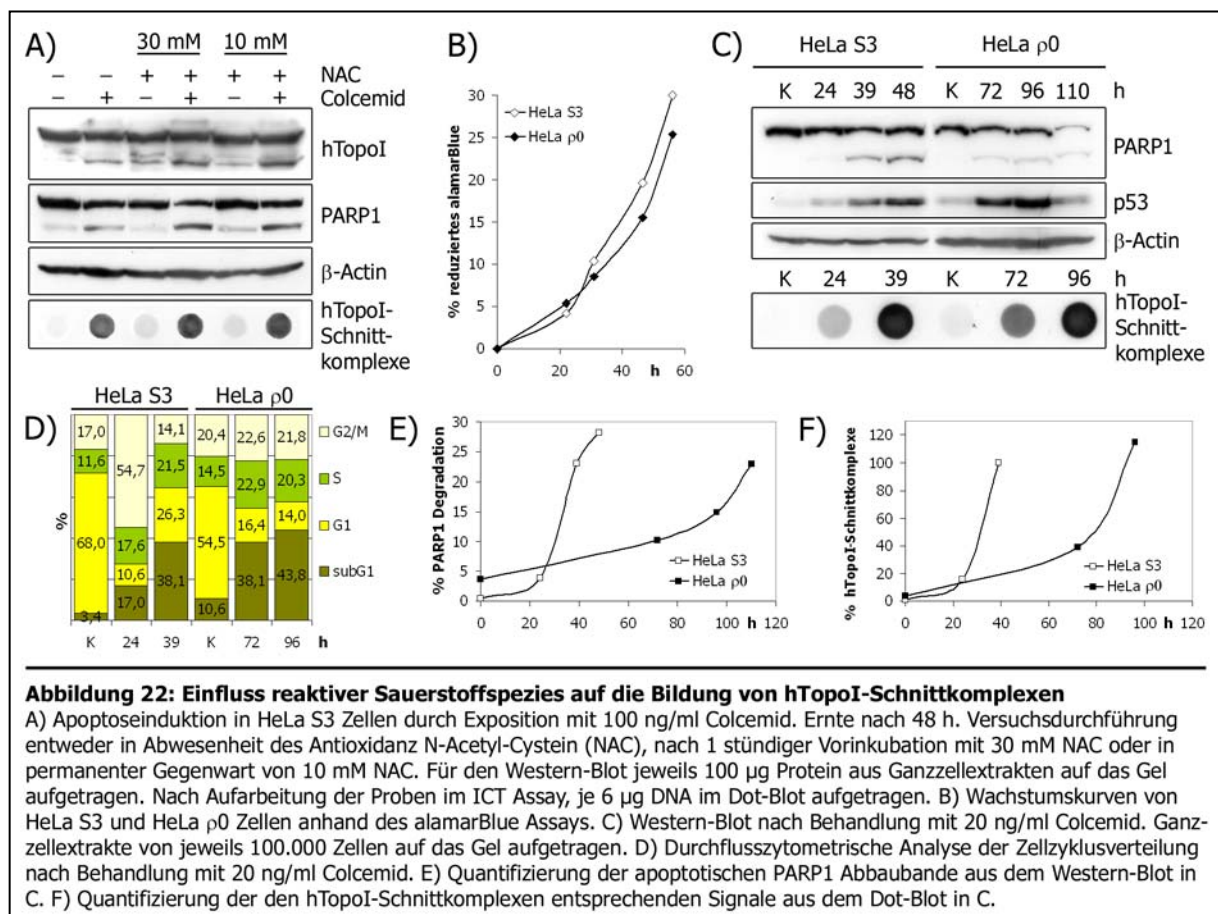
Anhand der Exposition mit Colcemid und  $\text{TNF}\alpha$  konnte gezeigt werden, dass hTopoI-Schnittkomplexe auch ohne ausdrückliche Schädigung der DNA in apoptotischen Zellen

entstehen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die generell im Zuge der Apoptose vermehrt aus dem Mitochondrium freigesetzt werden (Giorgio *et al.*, 2005), sekundär oxidative DNA-Schäden und dementsprechend eine hTopoI-Schadensantwort induzieren können (Sordet *et al.*, 2004b). Um dies zu überprüfen, wurde zunächst versucht die freigesetzten ROS mittels eines Radikalfängers zu entgiften. Sordet *et al.* konnten zeigen, dass eine Vorinkubation mit N-Acetyl-L-Cystein (NAC) die Anzahl der reaktiven Sauerstoffspezies bei Apoptoseinduktion mit Arsenik und Staurosporin signifikant reduzierte (Sordet *et al.*, 2004a; Sordet *et al.*, 2004c). Das Antioxidanz NAC besitzt per se die Fähigkeit ROS zu entgiften und erhöht gleichzeitig als Vorläufermolekül den intrazellulären Glutathionspiegel (Aruoma *et al.*, 1989; De Flora *et al.*, 2001). Zur Apoptoseinduktion wurden HeLa S3 Zellen für 48 h mit 100 ng/ml Colcemid behandelt. Die Gabe von NAC erfolgte entweder als Vorinkubation mit 30 mM für 1 h, oder zusätzlich zur Colcemidinkubation über den gesamten Zeitraum mit einer Konzentration von 10 mM. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Antioxidanz oder nur mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt. Die zusätzliche Gabe von NAC hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen nach Colcemidbehandlung (Abbildung 22 A). Teilweise war sogar eine leicht verstärkende Wirkung bei der Apoptoseinduktion zu beobachten. Eine schwache Abbaubande von PARP1 und hTopoI war bereits bei alleiniger Inkubation mit NAC zu beobachten.

Unabhängig von der Verwendung eines Radikalfängers wurde die HeLa  $\rho 0$  Zelllinie untersucht, die aufgrund des Fehlens der mitochondriellen DNA keine funktionsfähige Atmungskette besitzt. Hoffmann *et al.* konnten zeigen, dass HeLa  $\rho 0$  Zellen einen wesentlich verringerten basalen Spiegel an ROS im Vergleich zur Wildtypzelllinie aufweisen (Hoffmann *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis unterstützt die allgemeine Theorie, dass die Elektronentransportkette im Mitochondrium die hauptsächliche Quelle intrazellulärer ROS ist (Boveris and Chance, 1973). Da die HeLa  $\rho 0$  Zellen ihren gesamten Energiebedarf durch die Glykolyse abdecken müssen, zeigen sie ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zur Wildtypzelllinie. Dies kann anhand einer Gegenüberstellung der Wachstumskurven von HeLa S3 und HeLa  $\rho 0$  Zellen bestätigt werden (Abbildung 22 B). Die durchschnittliche metabolische Aktivität der HeLa  $\rho 0$  Zellen beträgt nur etwa 85% der HeLa S3 Zellen. Entsprechend der M-Phase spezifischen Wirkung, ist bei der Behandlung mit Colcemid auch eine leicht verzögerte Apoptoseinduktion in der HeLa  $\rho 0$  Zelllinie zu erwarten. Aufgrund der fördernden Rolle von ROS bei der Ausführung des apoptotischen Programms, kann ebenfalls ein gebremster Ablauf der Apoptose in den HeLa  $\rho 0$  Zellen vermutet werden. Anhand der Intensität der PARP1 Abbaubande im Western-Blot (Abbildung 22 C) ist ersichtlich, dass erst nach 72 h Inkubation von HeLa  $\rho 0$  Zellen mit Colcemid ein ähnlicher Anteil an PARP1 degradiert wurde, wie in HeLa S3 Zellen bereits nach 24 – 39 h. Besonders deutlich wird die verzögerte Apoptose auch in Abbildung 22 E, in der die PARP1 Spaltung als Marker für den programmierten Zelltod in Abhängigkeit der Zeit dargestellt ist. Zur Anfertigung dieses Diagramms wurden die Intensitäten der Abbaubande und der Bande für das vollständige Protein

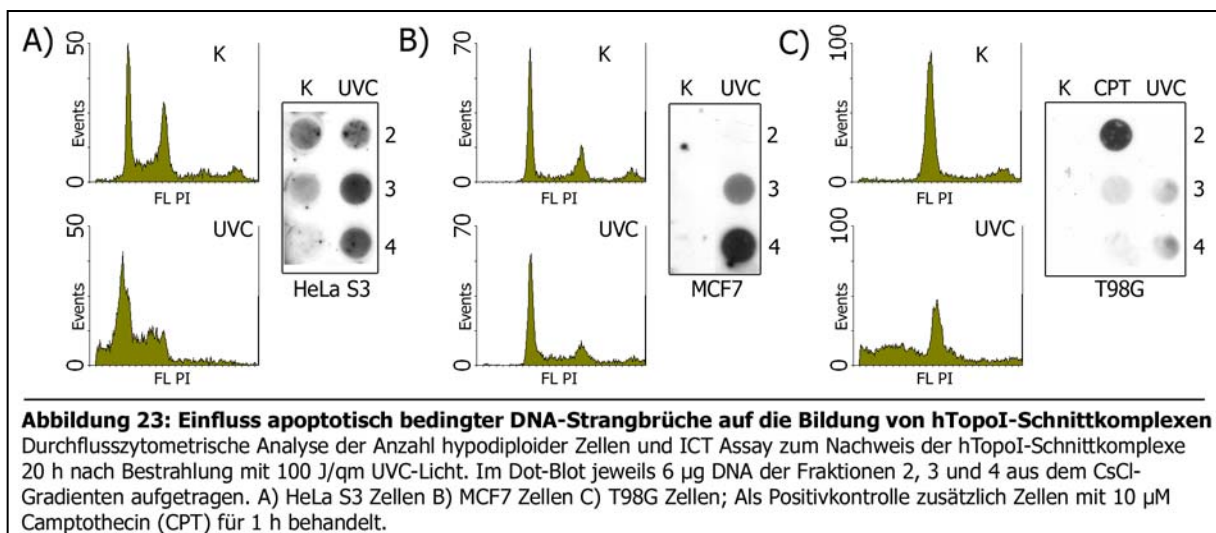


quantifiziert und der jeweilige Anteil an der Gesamtintensität beider Signale errechnet. In vergleichbarem Maße wie die PARP1 Degradation, war auch die Bildung der hTopoI-Schnittkomplexe in den HeLa  $\rho 0$  Zellen verzögert. Gut ersichtlich ist dies anhand des Diagramms in **Abbildung 22 F**. Analog zur PARP1 Spaltung wurden hier die Signale der hTopoI-Schnittkomplexe aus den Dot-Blot quantifiziert und in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Colcemid aufgetragen. Als Referenzpunkt diente die 39 h Probe der HeLa S3 Zellen, deren Signalintensität als 100% festgelegt wurde. Die Quantifizierung der Signale ermöglichte außerdem eine genauere Gegenüberstellung der beiden Zelllinien. Nach 24 h wurden in den HeLa S3 Zellen im Vergleich zur 72 h Probe der HeLa  $\rho 0$  Zelllinie sowohl 40% weniger PARP1 Moleküle gespalten, als auch etwa 40% weniger hTopoI-Schnittkomplexe gebildet. Trotz einer verzögerten Antwort war dennoch eine deutliche Akkumulation von hTopoI-Schnittkomplexen in der HeLa  $\rho 0$  Zelllinie nachweisbar (**Abbildung 22 C unterste Reihe**). Diese Ergebnisse deuten an, dass ROS zwar einen fördernden Einfluss auf die Apoptose und damit indirekt auch auf die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen besitzen können. Jedoch ist es eher unwahrscheinlich, dass ROS und die daraus resultierenden oxidativen DNA-Schäden die Hauptursache der hTopoI-Schadensantwort darstellen.



#### 4.8. Einfluss apoptotisch bedingter DNA-Strangbrüche auf die hTopoI-Schnittkomplexbildung

Ein weiteres Nebenprodukt vieler zytotoxisch wirkender Substanzen ist die Einführung von DNA-Strangbrüchen. Darüber hinaus tritt auch im Zuge der fortgeschrittenen Apoptose, unabhängig vom Stimulus des programmierten Zelltodes, eine intensive Fragmentierung der zellulären DNA auf (Einleitung S.22). *In vitro* Versuche im Hefesystem konnten zudem zeigen, dass Topoisomerase I durch Strangbrüche auf Oligonukleotid-Substraten arretiert werden kann (Lebedeva et al., 2006). Das Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen wäre demzufolge eine mögliche Ursache für das generelle Auftreten einer hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit zytotoxischen Substanzen. In HeLa S3 Zellen korreliert die Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe gut mit der apoptotischen Fragmentation nach Bestrahlung mit UVC-Licht (Abbildung 23 A), aber auch nach Colcemidbehandlung und oxidativem Stress (vergleiche Abbildungen 17, 18). Im Gegensatz dazu zeigten die Caspase 3-defizienten MCF7 Zellen trotz Abwesenheit der oligonukleosomalen DNA-Fragmentation in der Apoptose eine deutliche hTopoI-Schadensantwort (Abbildung 23 B, vergleiche Abbildungen 19, 21). Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass Zelllinien mit Defekten in verschiedenen Reparaturproteinen eine verringerte hTopoI-Schnittkomplexbildung aufweisen, obwohl ein äquivalentes Schadensniveau eingeführt wurde (siehe auch Abbildung 24). Nach Exposition der humanen Glioblastomzelllinie T98G mit UVC-Strahlung (100 J/qm) war eine drastische Erhöhung des Anteils an hypodiploiden Zellen in der Durchflusszytometrie ersichtlich. Trotz dieser starken apoptotischen Fragmentation der DNA konnte nur eine sehr schwache Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe nachgewiesen werden (Abbildung 23 C). Als Positivkontrolle ist zusätzlich die hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Inkubation mit Camptothecin gezeigt. Das Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen per se scheint demzufolge nicht ausreichend zu sein, um eine hTopoI-Schadensantwort zu aktivieren. Eine mögliche Begründung für das verminderte Vermögen der T98G Zellen eine hTopoI-Schadensantwort auszuprägen, wäre die Mutation des Tumorsuppressorproteins p53. Für p53 konnte bereits eine wichtige Rolle bei der hTopoI-Schadensantwort gezeigt werden, wobei ein differenzierter Einfluss verschiedener p53-



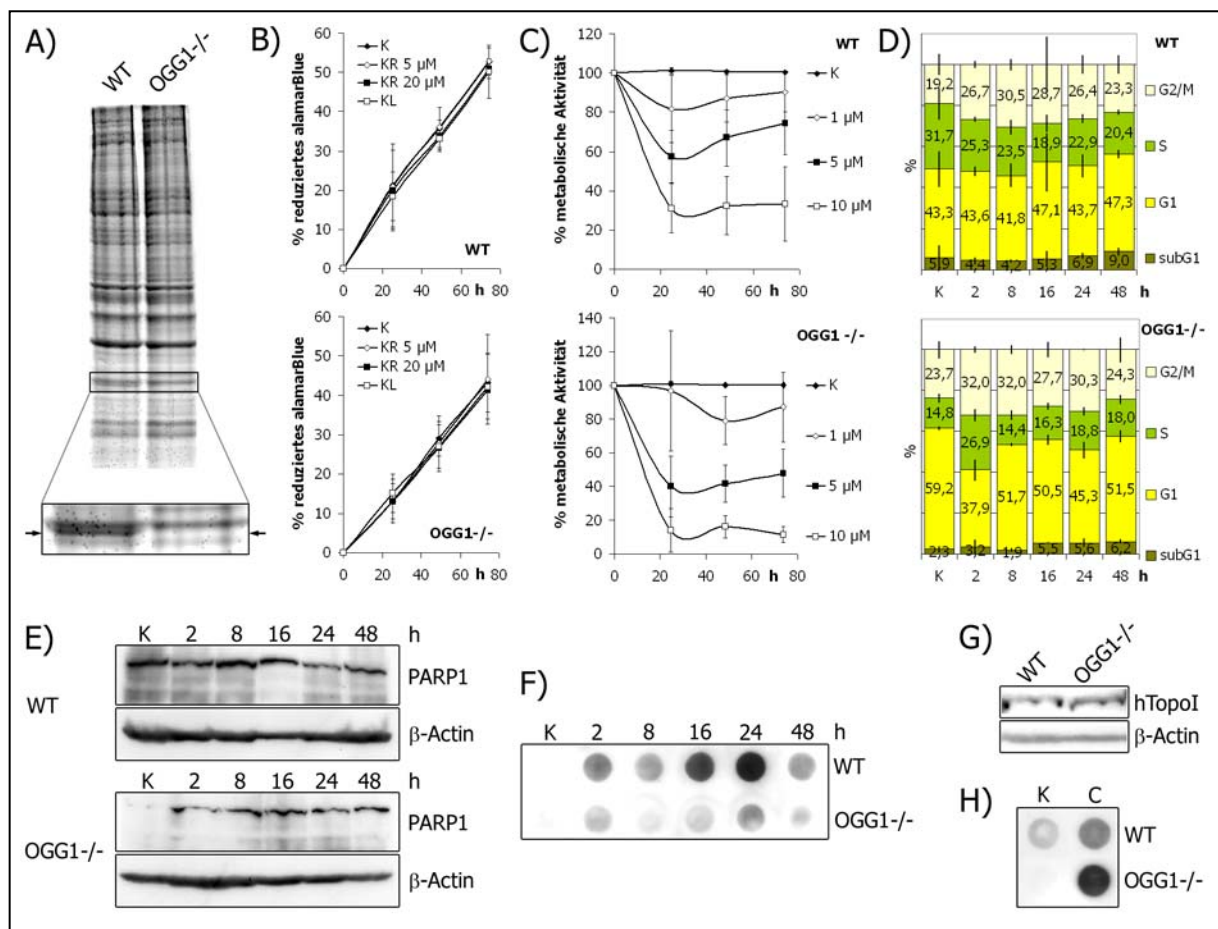
Mutationen diskutiert wurde (Einleitung S.14).

#### 4.9. hTopoI-Schadensantwort in einer Zelllinie mit defekter Basenexzisionsreparatur

Die vorangegangenen Ergebnisse beleuchteten vor allem den potentiellen Zusammenhang einer starken hTopoI-Schnittkomplexbildung mit der Apoptose. Anhand der Experimente mit subletalen Dosen an UVC-Strahlung (Punkt 4.1) bzw. geringem Niveau an oxidativer Schädigung (Punkt 4.3) ergeben sich zudem Hinweise auf eine weitere Rolle der Schnittkomplexbildung im zellulären Geschehen. Eine im Vergleich zur Apoptose schwächere aber deutlich detektierbare, transiente hTopoI-Schadensantwort ist dabei nachweisbar, die vermutlich im Zuge von Reparaturprozessen auftritt (Abbildungen 14 A, 15 A und 17 I). Die Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen nach DNA-schadensunabhängiger Apoptoseinduktion deutet zudem darauf hin, dass nicht der DNA-Schaden selbst alleinige Ursache für die Arretierung der hTopoI auf der DNA sein kann. Vielmehr scheint die hTopoI-Schadensantwort durch Signalwege im Zuge einer zellulären Stressantwort vermittelt zu werden. Durch welche Faktoren könnte die hTopoI demzufolge zur DNA rekrutiert werden bzw. durch welchen Mechanismus wird der katalytische Zyklus unterbrochen und die hTopoI auf der DNA gefangen? Bereits in den ersten *in vivo* Arbeiten zur hTopoI-Schadensantwort finden sich Hinweise auf die Abhängigkeit der hTopoI-Schnittkomplexbildung von der Funktionsfähigkeit eines DNA-Reparaturweges (Rosenstein et al., 1997). Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Zellen mit einem Defekt in den Reparaturproteinen XPA oder XPD eine schwächere hTopoI-Schadensantwort nach Bestrahlung mit UVB-Licht induzieren als die zugehörige Wildtypzelllinie (Subramanian et al., 1998). Diese Ergebnisse unterstützen zusätzlich den DNA-schadensunabhängigen Mechanismus der Schnittkomplexbildung, da trotz eines gleichen Schadensniveaus eine unterschiedliche hTopoI-Antwort detektiert werden konnte. Wenn also die hTopoI nicht selbst der Sensor des DNA-Schadens ist, könnte die Funktionsfähigkeit des entsprechenden zellulären Detektionssystems Voraussetzung für die Induktion einer hTopoI-Schadensantwort sein.

Im Gegensatz zu UV-induzierten Schäden, werden oxidative DNA-Läsionen vor allem von Proteinen des Basenexzisions-Reparatursystems (BER) detektiert und repariert. Weisen BER-defiziente Zellen dementsprechend auch eine verringerte hTopoI-Schadensantwort nach Induktion oxidativer DNA-Schäden auf? Für diese Untersuchungen standen eine murine embryonale Fibroblastenzelllinie (MEF) mit einem homozygoten 8oxoG-Glykosylase 1 (OGG1) Knock-out sowie die entsprechenden Wildtypzellen zur Verfügung. OGG1 bindet und entfernt spezifisch Cytidin-gepaartes 8oxoG und initiiert dadurch den Reparaturprozess (Einleitung S.19). Abbildung 24 A zeigt das Coomassie-Gel eines Ganzzelllysates der Wildtypzelllinie im Vergleich zur OGG1 Knock-out Zelllinie. Die An- bzw. Abwesenheit der OGG1-Bande (bei etwa 39 kD, markiert durch einen Pfeil) wurde massenspektrometrisch belegt. Der Nachweis von OGG1 im Western-Blot war ohne Erfolg, da die eingesetzten Antikörper keine ausreichende Spezifität

aufwiesen. Eine Induktion oxidativer Basenläsionen kann in Kulturzellen durch Behandlung mit der photoreaktiven Substanz Ro19-8022 erreicht werden (Methoden S.25). Im Gegensatz zu den Experimenten mit HeLa S3 Zellen (Punkt 4.3), sollte hier jedoch ausschließlich unter Bedingungen gearbeitet werden, die keine Apoptose induzieren. Die Wachstumskurven in Abbildung 24 B zeigten keine Beeinflussung des Zellwachstums bei alleiniger Inkubation mit Ro19-8022 (KR) bzw. bei Exposition mit Licht ohne die photoreaktive Substanz (KL) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). Hingegen konnte ein deutlicher dosisabhängiger Einfluss auf die metabolische Aktivität detektiert werden, wenn die photoreaktive Substanz in Verbindung mit Belichtung verabreicht wurde. Eine signifikante und dauerhafte Verringerung der Zellvitalität war dabei ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 zu beobachten (Abbildung 24 C). Bei einem Vergleich der OGG1 Knock-out Zelllinie mit dem Wildtyp wird die erhöhte Sensitivität der reparaturdefizienten Zelllinie gegenüber oxidativen DNA-Schäden deutlich. Nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 waren jedoch in beiden Zelllinien keine Anzeichen für Apoptose ersichtlich. Die



**Abbildung 24: hTopoI-Schadensantwort in OGG1-defizienten Zellen**

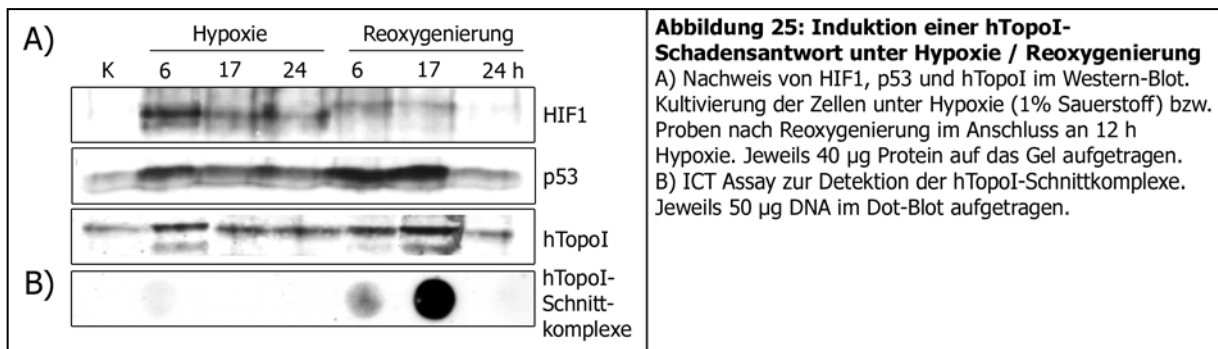
A) Coomassie-gefärbtes Gel aus Ganzzelextrakten von je 100.000 MEF WT und OGG1<sup>-/-</sup> Zellen. Der Bereich um die markierte Bande wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. B) Wachstumskurven beider Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Ro19-8022 Konzentrationen ohne Belichtung (KR) bzw. nach Exposition mit Licht in Abwesenheit der photoreaktiven Substanz (KL) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (K). C) Metabolische Aktivität der unter Belichtung mit verschiedenen Ro19-8022 Konzentrationen behandelten Zellen in Abhängigkeit der Zeit. D) Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und Belichtung. E) PARP1 Nachweis im Western-Blot nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und Belichtung. Ganzzeillysate von je 200.000 Zellen auf das Gel aufgetragen. F) Nachweis der hTopoI-Schnittkomplexe entsprechend des ICT Assays, nach Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 und Belichtung. Jeweils 6  $\mu\text{g}$  DNA aufgetragen. G) Western-Blot zum Nachweis des hTopoI-Proteingehaltes in beiden Zelllinien. Ganzzelextrakte von je 100.000 Zellen auf das Gel aufgetragen. H) Detektion der hTopoI-Schadensantwort im ICT Assay nach 48 h Inkubation mit 100 ng/ml Colcemid. Jeweils 6  $\mu\text{g}$  DNA aufgetragen.



charakteristische Abbaubande von PARP1 ist in [Abbildung 24 E](#) bis 48 h nach Behandlung nicht detektierbar. Des Weiteren konnte auch keine signifikante Erhöhung der Anzahl hypodiploider Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden ([Abbildung 24 D](#)). Die detektierte Abnahme der metabolischen Aktivität nach Exposition mit 1  $\mu$ M Ro19-8022 und gleichzeitiger Belichtung ist nur vorübergehend ([Abbildung 24 C](#)). Sie resultiert wahrscheinlich aus dem zu beobachtenden leichten G2/M-Phase Arrest ([Abbildung 24 D](#)), der nach Schädigung der DNA auftritt. Analog zu den Ergebnissen mit der HeLa S3 Zelllinie ([Abbildung 17 I](#)) konnte auch im MEF Wildtyp eine transiente hTopoI-Schadensantwort detektiert werden ([Abbildung 24 F](#)), sofern ein moderates Maß an DNA-Läsionen induziert wird, welches nicht zur Aktivierung des programmierten Zelltodes führt. Gleichbehandelte OGG1 Knock-out Zellen zeigten im Vergleich dazu eine stark verminderte Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen. Dieser Effekt wird nicht durch einen geringeren hTopoI Proteingehalt dieser Zelllinie verursacht ([Abbildung 24 G](#)). Darüber hinaus resultiert dieses Ergebnis auch nicht aus dem allgemeinen Unvermögen der Knock-out Zelllinie, hTopoI-Schnittkomplexe zu bilden. Nach Apoptoseinduktion mit Colcemid war in den OGG1 Knock-out Zellen sogar eine stärkere hTopoI-Schadensantwort im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar ([Abbildung 24 H](#)). Demzufolge scheint die Funktionsfähigkeit der zellulären Sensor- und Signalprozesse einen deutlichen Einfluss auf die Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe zu besitzen. Die Wiederherstellung des Wildtypstatus in der Knock-out Zelllinie sollte folglich auch zu einer Wiederherstellung der hTopoI-Schadensantwort führen. Die Transfektion eines OGG1 kodierenden Vektors ([Methoden S.31](#)) führte jedoch nicht zu einer ausreichenden Expression der Glykosylase. Die Anwesenheit des OGG1 Proteins war in der transfizierten Zelllinie massenspektrometrisch nicht nachweisbar. Eine Optimierung der Transfektion zur Steigerung der Transfektionseffizienz wäre ein erster Ansatzpunkt für weitere Experimente.

#### 4.10. Induktion einer hTopoI-Schadensantwort nach Hypoxie / Reoxygenierung

Oxidativer Stress, der durch den aeroben Metabolismus bedingt wird, stellt einen physiologisch äußerst relevanten Induktor zellulärer Schädigung dar. Die Folge nicht effizient reparierter oxidativer Basenläsionen, wie dem 8oxoG, kann die kanzerogene Entartung der Zelle sein. Im Gegensatz dazu führt das zunehmende starke Wachstum eines soliden Tumors sehr schnell zur Unterversorgung der Krebszellen mit Sauerstoff. Zelluläre Signalwege, die unter hypoxischen Bedingungen aktiviert werden, spielen eine bedeutende Rolle beim Fortschreiten der Tumorentwicklung. Deshalb war es auch interessant, MCF7 Zellen, die unter leichter Hypoxie (1% Sauerstoff) kultiviert und anschließend reoxygeniert wurden, auf die Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe zu untersuchen. Die Aktivierung einer intrazellulären Signalkette unter Sauerstoffmangelbedingungen kann durch Nachweis des Transkriptionsfaktors HIF1 (hypoxia inducible factor 1) verfolgt werden, dessen rascher Abbau unter Hypoxie blockiert wird. Der Western-Blot in [Abbildung 25 A](#) zeigt eine deutliche HIF1-Bande unter hypoxischen Bedingungen,



deren Intensität nach Reoxygenierung wieder abnimmt. Weiterhin war während der Sauerstoffmangelphase eine leichte Hochregulation des p53-Proteingehaltes zu beobachten, die ihr Maximum kurz nach Reoxygenierung erreichte und anschließend auf das Ausgangsniveau der Kontrolle zurückging. Unter hypoxischen Bedingungen war nur eine sehr schwache und transiente hTopoI-Schadensantwort detektierbar (Abbildung 25 B). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen nach Reoxygenierung beobachtet werden, die ebenfalls transients Natur ist. Demzufolge tritt eine hTopoI-Schadensantwort auch unter physiologisch bedeutsamen Bedingungen im Tumorgewebe auf. Zeitgleich zur Detektion der hTopoI-Schnittkomplexe war eine leichte Erhöhung des hTopoI Proteingehaltes ersichtlich, sowie eine schwache hTopoI Abbaubande, die Folge einer beginnenden apoptotischen Degradation sein könnte. Inwiefern eine Apoptoseinduktion nach Reoxygenierung ursächlich für die hTopoI-Schadensantwort war, müsste in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

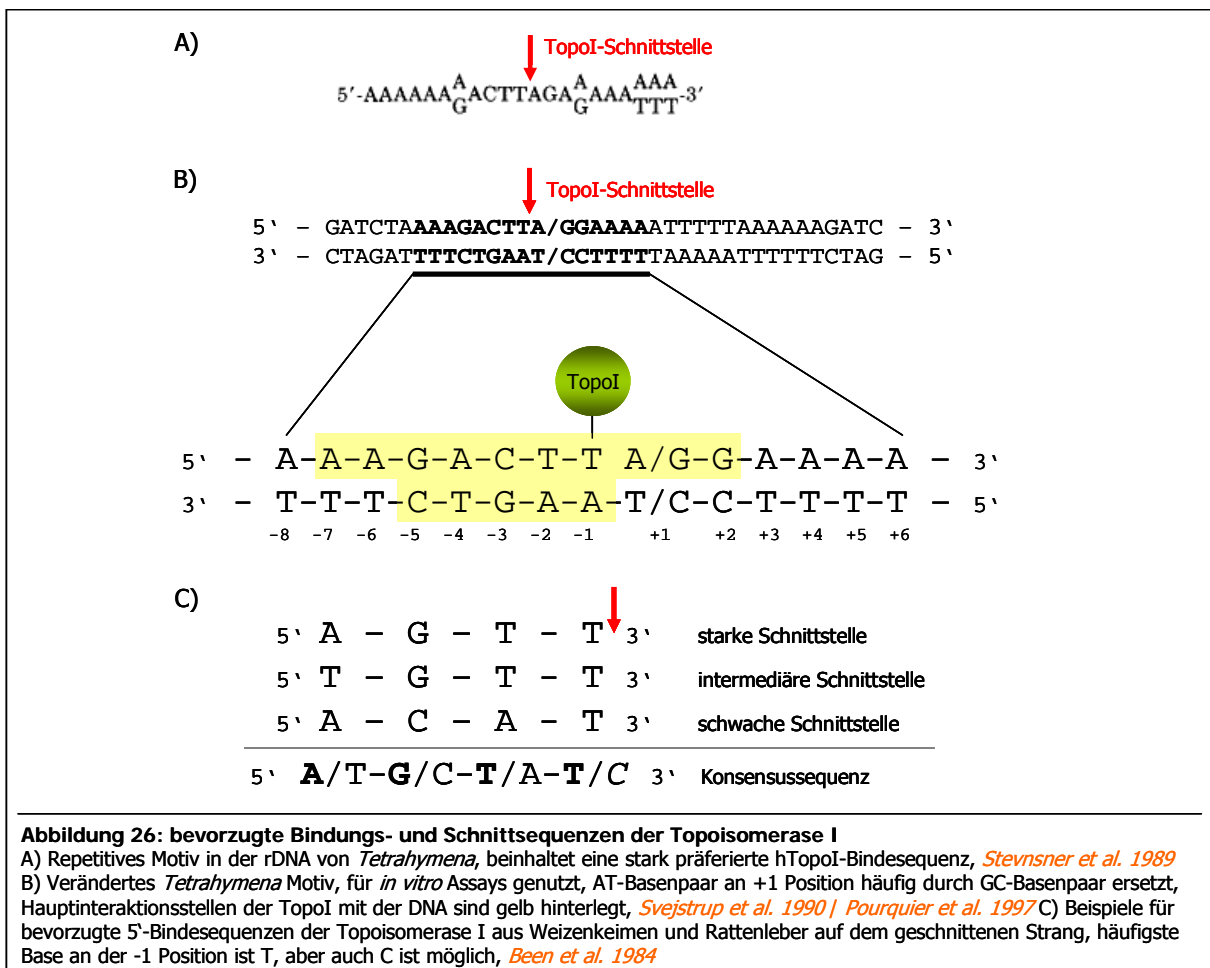
## 5. Diskussion

Eine hTopoI-Schadensantwort, d.h. die Detektion stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe ohne Einwirkung von hTopoI-Toxinen wurde erstmals Mitte der 90er Jahre beschrieben. Mit Hilfe eines speziellen Assays gelang es, kovalent auf der DNA gebundene hTopoI-Moleküle nach Exposition mit UVB-Licht nachzuweisen (Rosenstein et al., 1997). Diese Reaktion konnte als ein spezifisches Arretieren der Topoisomerase I belegt werden, welches nicht auf unspezifischem UV-Crosslinking DNA-bindender Proteine beruht und auch nicht für Topoisomerase II nachweisbar war (Subramanian et al., 1998). Erste Hinweise auf eine Beteiligung der Topoisomerase I an UV-induzierten DNA-Protein Crosslinks finden sich jedoch schon früher in der Literatur. Bereits 1988 konnten Rosenstein et al. feststellen, dass ein Teil der durch UV-Strahlung eingeführten Einzelstrangbrüche von kovalent gebundenen Proteinen umgeben ist (Lai and Rosenstein, 1990; Rosenstein, 1988). Weiterhin konnte trotz gleicher Strahlungsexposition eine reduzierte Bildung von DNA-Protein Crosslinks in einer UV-sensitiven Mutante im Vergleich zur Wildtypzelllinie beobachtet werden (Rosenstein et al., 1989). Ein unspezifisches UV-induziertes Crosslinken von Proteinen mit der DNA war hier somit auszuschließen. Die Bildung kovalenter Protein-DNA-Komplexe in der Wildtypzelllinie wurde in diesem Zusammenhang als Bestandteil des zellulären Überlebensmechanismus diskutiert und das entsprechende Gen später als *SUVCC3* (solar UV cross-complementing gene number 3) eingetragen (Rosenstein and Vaslet, 1995). Nach Etablierung des ICT Assays (Subramanian et al., 1995) konnte die Topoisomerase I als eines der kovalent gebundenen Proteine identifiziert werden und SUVCC3 wurde als ein möglicher Faktor bei der Stimulation der hTopoI-Schadensantwort beschrieben. Die zelluläre Funktion des *SUVCC3* Genproduktes ist bis heute unbekannt, wobei es jedoch nicht der Topoisomerase I selbst entspricht (Rosenstein et al., 1997). Welche Verbindung besteht folglich zwischen einer DNA-Schädigung und der Stabilisierung von hTopoI-Schnittkomplexen? Wird die hTopoI direkt durch die Anwesenheit eines DNA-Schadens arretiert oder ist die Stabilisierung der Schnittkomplexe ein streng regulierter Prozess, der durch das komplexe Signalnetzwerk der Zelle kontrolliert wird?

### 5.1. Wie entstehen stabilisierte hTopoI-Schnittkomplexe *in vivo*?

Zeitgleich mit den ersten *in vivo* Daten zur hTopoI-Schadensantwort erschienen diverse Publikationen, die eine verstärkte Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe nach Einführung unterschiedlicher DNA-Läsionen auf artifiziellen Substraten *in vitro* zeigten (Pourquier et al., 1998; Pourquier et al., 1997a; Pourquier et al., 1999; Pourquier et al., 1997b). Ausgangspunkt für diese Untersuchungen könnte die vorangegangene Identifikation der „all type mismatch nicking endonuclease (ATE)“ als Topoisomerase I (Yeh et al., 1994) gewesen sein, für die *in vitro* eine Schnittfähigkeit der Phosphodiesterbindung 5' zu allen möglichen Varianten einer Basenfehlpaarung detektierbar war (Yeh et al., 1991). Die zunächst postulierte Funktion der ATE war das spezifische Schneiden der DNA an Orten von Fehlpaarungen. Dabei konnte eine





Abhängigkeit der Schnitteffektivität von der Art der Fehlpaarung und der umgebenden Basensequenz beobachtet werden. Später stellte sich heraus, dass die detektierte Schnittstelle in einer bevorzugten Topoisomerase I-Bindesequenz (*Svejstrup et al., 1990*) (*Abbildung 26*) lokalisiert war. Auch alle anderen genannten *in vitro* Experimente wurden mit Oligonukleotiden durchgeführt, bei denen der DNA-Schaden in einer präferierten hTopoI-Bindesequenz eingeführt wurde. In der Arbeit von Yeh *et al.* (*Yeh et al., 1994*), war die Fehlpaarung jeweils direkt an der +1 Stelle, also unmittelbar 3' zur bevorzugten hTopoI Schnittstelle lokalisiert. Als Hypothese zur Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe wurde die Behinderung des Religationsschrittes durch die Fehlpaarung genannt, da der Schnitt in unmittelbarer Nähe zur DNA-Läsion stattfinden musste. Folglich wäre denkbar, dass je nach Art der Fehlpaarung, eine unterschiedlich starke Beeinflussung der DNA-Konformation zu einer unterschiedlich starken Stabilisierung des hTopoI-Schnittkomplexes führt und sich somit auf die Schnitteffektivität auswirkt. Eine vermehrte Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen war in nachfolgenden Untersuchungen fast immer nachzuweisen, sofern die DNA-Läsion an der +1 Position eingeführt worden war (*Abbildung 27*). Diese Arretierung der hTopoI ist meist in der von Yeh *et al.* postulierten Behinderung der Religationsreaktion begründet. Dabei scheint die lokale Konformationsveränderung am freien 5'-OH Ende der entscheidende Faktor zu sein, da eine 6-Thio-Guanin Läsion an der +1 Position bei korrekter Paarung mit Adenin nicht zur Stabilisierung des hTopoI-Schnittkomplexes führte (*Pourquier et al., 2001*). Lediglich der Einbau von 8oxoG (*Pourquier et al., 1999*) und

Gemcitabine (Pourquier et al., 2002) an der +1 Position resultierte in einer Verstärkung der Bindung bzw. Schnittreaktion des Enzyms. Die von Yeh et al. beschriebene Abhängigkeit der Schnitteffizienz von der die DNA-Läsion umgebende Basensequenz, wäre mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Veränderung der präferierten Bindesequenz der hTopoI zu begründen. Auch der beobachtete Einfluss der Basensequenz der Fehlpaarung selbst wäre damit erklärbar. Der für die Bindung der hTopoI kritische Bereich umfasst vor allem die vier Basen 5' zur Schnittstelle (Been et al., 1984). Die Einführung von Fehlpaarungen an bestimmten Positionen in diesem Bereich führte im Einklang damit zur absoluten

DNA-Läsion		Referenz
Fehlpaarungen Abasische Stellen Ungepaarte Insertionen	IR	<i>Pourquier et al. 1997</i>
Strangbrüche Lücken	IR	<i>Pourquier et al. 1997</i>
Ethenoaddukte	IR	<i>Pourquier et al. 1998</i>
8oxoG 5' Hydroxy-Cytosine	BB ?	<i>Pourquier et al. 1999</i>
araC	IR	<i>Pourquier et al. 2000</i>
O-6-Methylguanin	IR	<i>Pourquier et al. 2001</i>
Interkalatoren	IR	<i>Pommier et al. 2002</i>
Gemcitabine	BS	<i>Pourquier et al. 2002</i>
Tripelhelix	IR	<i>Antony et al. 2004</i>
Benzo[a]pyren Addukte	IR	<i>Pommier et al. 2000</i>

**Abbildung 27:** DNA-Läsionen, die bei Einführung an der +1 Position einer bevorzugten hTopoI-Bindesequenz *in vitro* zur Stabilisierung von hTopoI-Schnittkomplexen führen. Mechanismus IR: Inhibierung der Religation, BB: bevorzugte Bindung, BS: bevorzugte Schnittreaktion

Verhinderung einer Schnittreaktion (Pourquier et al., 1997b). Entsprechend würde die Topoisomerase nicht per se den Schaden erkennen, sondern nach Bindung und Schnitt der bevorzugten Sequenz, bei zufälliger Anwesenheit eines DNA-Schadens an der +1 Position auf der DNA arretiert werden.

Im Gegensatz dazu konnten auch veränderte Schnittpositionen der hTopoI beobachtet werden, wenn DNA-Läsionen; wie Strangbrüche (Pourquier et al., 1997a), abasische Stellen, Fehlpaarungen (Pourquier et al., 1997b) oder 8oxoGs (Pourquier et al., 1999) in den kritischen 5'-Bindebereich eingeführt wurden. Eine häufig beobachtete Schnittstelle befand sich dabei 2 Nukleotide aufwärts der charakteristischen Schnittposition (Abbildung 26 B). Jedoch weist auch hier der entsprechend neue 5'-Bereich eine große Übereinstimmung mit der bevorzugten hTopoI-Bindesequenz auf. Diese Schnittstelle konnte ebenfalls detektiert werden, wenn Interkalatoren (Pommier et al., 2002) oder Benzo[a]pyren Addukte (Pommier et al., 2000a) an der +1 Position lokalisiert waren. Von einer gezielten Erkennung und Bindung der DNA-Läsion kann deshalb auch hier nicht ausgegangen werden. Möglicherweise dient diese Position als alternative Schnittstelle, wenn die Bindung der charakteristischen Sequenz durch den DNA-Schaden sterisch behindert ist. Interessanter sind hingegen Schnittstellen, die unabhängig der bevorzugten Sequenz nach Einführung von DNA-Schäden entstehen (Pommier et al., 2000a; Pourquier et al., 2002; Pourquier et al., 1997b). Doch auch hier konnte keine Kollokalisierung der Schnittstelle mit der Position der DNA-Läsion beobachtet werden. Die Untersuchung des hTopoI-Schnittmusters in UV-

geschädigten Plasmiden zeigte ebenfalls Schnittstellen unabhängig von einer bevorzugten Bindesequenz, jedoch auch unabhängig von der direkten Position der DNA-Läsionen (Lanza et al., 1996). Über eine weitreichende, durch den DNA-Schaden induzierte Veränderung der Konformation, die eine Bindung der hTopoI sequenzunabhängig begünstigen könnte, kann diskutiert werden. Eine Abhängigkeit der hTopoI-DNA-Interaktion von der DNA-Konformation ist bereits bekannt (Camilloni et al., 1989). Dementsprechend wären auch die Ergebnisse erklärbar, die eine Stabilisierung des hTopoI-Schnittkomplexes an der charakteristischen +1 Position zeigten, obwohl die eingeführte DNA-Läsion bereits außerhalb der konservierten 5'-Bindesequenz lokalisiert waren (Pourquier et al., 1997b). Bindungsstudien der hTopoI mit der DNA belegen zudem eine Interaktion über insgesamt circa 14 Nukleotide, die vor allem 5' zur Schnittstelle orientiert sind (Been et al., 1984; Stevensner et al., 1989; Svejstrup et al., 1990). Somit könnte auch ein weiter entfernt liegender DNA-Schaden die Bindung der hTopoI beeinflussen. Zusammenfassend zeigen die *in vitro* Experimente, dass DNA-Schäden einen unterschiedlichen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzen, je nachdem wo sie in der Binde/Schnittsequenz lokalisiert sind oder wie sie die DNA-Konformation verändern. Eine gezielte Bindung des DNA-Schadens durch die hTopoI ist jedoch nicht zu belegen.

In den folgenden Jahren konnte eine hTopoI-Schadensantwort in Kulturzellen nach Einführung diverser DNA-Läsionen nachgewiesen werden (Einleitung S.9 Tabelle 3). Der Mechanismus für die Arretierung der hTopoI *in vivo* ist jedoch nicht aufgeklärt. Eine Stabilisierung des Schnittkomplexes könnte z.B. dann erfolgen, wenn die Topoisomerase im Zuge Ihrer Relaxierungsfunktion vor Replikations- oder Transkriptionskomplexen auf einen DNA-Schaden trifft. Im Falle der Replikation müsste die Bildung stabilisierter Schnittkomplexe S-Phase-abhängig sein. In der Literatur ist die hTopoI-Antwort jedoch als S-Phase-unabhängiger Prozess beschrieben (Subramanian et al., 1998). Selbst in G1-synchronisierten Zellen war nach Bestrahlung mit UV-Licht die Bildung stabilisierter Schnittkomplexe zu beobachten (Mao et al., 2000a). Auch eigene vorläufige Daten zeigen eine hTopoI-Schadensantwort in Zellen, die durch Serumentzug in die G0-Phase überführt wurden. Die Untersuchung einer Abhängigkeit von Transkriptionsvorgängen wäre somit interessant, da diese auch in der G1- und G0-Phase ablaufen. Zudem ist bekannt, dass die hTopoI mit der RNA Polymerase I während der Transkription der rDNA kolokalisiert (Christensen et al., 2004). Bei der Betrachtung der zellulären Situation darf zudem die bei *in vitro* Experimenten fehlende Beeinflussung der hTopoI-Reaktion durch andere Proteinfaktoren nicht vernachlässigt werden. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Abwesenheit verschiedener Proteine zu einer verringerten hTopoI-Schadensantwort führt. Demzufolge scheinen die Aktivität der hTopoI sowie die Bildung von Schnittkomplexen *in vivo* nicht nur von der DNA-Sequenz oder Konformation, sondern auch von der Interaktion mit zellulären Proteinen abhängig zu sein. Rosenstein *et al.* waren die Ersten, die einen Proteinfaktor identifizieren konnten, der eine wichtige Rolle bei der Induktion einer hTopoI-Schadensantwort zu spielen scheint (Rosenstein et al., 1997). Die Funktion des SUVCC3

Genproduktes ist jedoch bis heute unbekannt. Weitergehende Forschungen konnten ebenso eine reduzierte hTopoI-Schadensantwort in XPA- und XPD-defizienten Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp feststellen (Subramanian et al., 1998). Die Anwesenheit der UV-induzierten DNA-Läsionen alleine scheint demzufolge nicht ausreichend zu sein, um die Topoisomerase effektiv auf der DNA zu arretieren. Auch Larsen *et al.* postulierten für die *in vivo* Reaktion eine Rekrutierung der hTopoI zum DNA-Schaden, die durch eine Interaktion mit weiteren Proteinen vermittelt wird (Larsen and Gobert, 1999). Als mögliches Bindeglied wurde der Transkriptionsfaktor TFIID genannt, der die Topoisomerase I im Zuge der Transkriptionsinitiation zur DNA rekrutiert. Bestärkend kommt dabei hinzu, dass die Helikase XPD ein Bestandteil des TFIID ist, der zudem eine wichtige Rolle bei der Schadenserkenkung und -Signalisierung im Zuge der NER spielt. Auch XPA wird teilweise als DNA-schadenerkennender Faktor bei der NER diskutiert, dient jedoch wahrscheinlicher der Schadensverifizierung und der korrekten Positionierung der Endonukleasen (Schärer, 2003). Entsprechend wäre es denkbar, dass erst nach initialer Erkennung des DNA-Schadens durch spezialisierte Faktoren der verschiedenen Reparaturwege eine Rekrutierung der hTopoI zur DNA erfolgt. Um diese These zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Kinetik der hTopoI-Schnittkomplexbildung in OGG1-defizienten Mausfibroblasten im Vergleich zur Wildtypzelllinie unter Bedingungen von oxidativem Stress untersucht. Oxidative Basenläsionen werden bevorzugt durch den Mechanismus der BER repariert. OGG1 erkennt und entfernt dabei spezifisch Cytosin-gepaartes 8oxoG und initiiert dadurch die Reparatur (Schärer, 2003). Auch bei diesen Untersuchungen zeigte sich ein deutlich vermindertes hTopoI-Schnittkomplexlevel in Abwesenheit der schadenerkennenden Glykosylase (Abbildung 24 F S.48). Die Gegenwart von oxidativen Schäden in der OGG1-defizienten Zelllinie war somit nicht ausreichend, um einen wesentlichen Anteil der zellulären Topoisomerasemoleküle auf der DNA zu arretieren. Für eine effektive Aktivierung der hTopoI-Schadensantwort scheint daher die Funktionsfähigkeit des entsprechenden schadendetektierenden Mechanismus wichtig zu sein. Analoge Experimente mit MMR-defizienten Zellen nach Induktion von Fehlpaarungen durch Behandlung mit *N*-Methyl-*N*-Nitro-*N*-Nitroso-Guanidin (MNNG) wurden bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Auch dabei war eine entsprechende Tendenz erkennbar (nicht publizierte Daten, Diplomarbeit Therese Wilhelm). Interessant wäre weiterhin die Untersuchung der OGG1<sup>-/-</sup> Zelllinie nach Einführung eines Schadensspektrums, welches die NER oder MMR aktiviert. Da diese Reparaturwege in den OGG1-defizienten Zellen funktionsfähig sind, sollte unter diesen Bedingungen eine signifikante Schnittkomplexbildung nachweisbar sein. Eine erste Bestätigung liefern die Ergebnisse nach Behandlung mit Colcemid, wobei die Funktionsfähigkeit der BER ebenfalls keine Rolle spielen sollte. Hier konnte eine deutliche hTopoI-Schadensantwort in der OGG1<sup>-/-</sup> Zelllinie detektiert werden (Abbildung 24 H S.48), die sogar stärker als in den Wildtypzellen ausgeprägt war. Entsprechend besitzen diese Zellen kein generelles Unvermögen stabilisierte hTopoI-Schnittkomplexe zu bilden.

Die Colcemidexperimente unterstützen zudem die Hypothese, dass DNA-Schäden nicht nur kein direkter Induktor, sondern auch keine unbedingte Voraussetzung für die Aktivierung der hTopoI-Schadensantwort sind. Colcemid gehört zu den Mikrotubuli-interferierenden Agenzien und verhindert durch die Blockierung der Tubulinpolymerisation die korrekte Ausbildung der Kernspindel. Dies führt zunächst zu einem Zellzyklusarrest in der Metaphase der Mitose, gefolgt von der Induktion des programmierten Zelltodes; sofern die Substanz über längere Zeit in hohen Dosen verabreicht wird (Mollinedo and Gajate, 2003; Sherwood et al., 1994). Colcemid ist somit ein pures Aneugen, dass per se keine DNA-Schädigung hervorruft (Brown and Bick, 1986; Stopper et al., 1994). Ein weiterer Apoptoseinduktor, der über den rezeptorvermittelten Weg und damit ebenfalls DNA-schadensunabhängig wirkt, ist  $\text{TNF}\alpha$ . Die Behandlung von Kulturzellen mit Colcemid und  $\text{TNF}\alpha$  gibt daher die Möglichkeit, hTopoI-Schnittkomplexe während einer allgemeinen zellulären Stresssituation zu untersuchen. Alle bisher publizierten Studien zur hTopoI-Schnittkomplexbildung wurden nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien durchgeführt. Begründet war dies in dem postulierten Mechanismus der Arretierung des kovalenten hTopoI-DNA-Komplexes durch den DNA-Schaden als unmittelbare Ursache. Die anhand der reparaturdefizienten Zelllinien erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch eine Einbindung der hTopoI-Schadensantwort in zelluläre Signalwege an, durch welche die hTopoI zur DNA rekrutiert wird. Im äußersten Fall könnte diese Rekrutierung auch nach Detektion von zellulärem Stress erfolgen, der unabhängig von einer DNA-Schädigung ist. Tatsächlich konnte nach Behandlung von MCF7 Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  eine starke Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen nachgewiesen werden (Abbildung 21 B S.43). Auch die Inkubation mit Colcemid führte zu einer deutlichen hTopoI-Schadensantwort in allen untersuchten Zelllinien (Abbildungen 18 D S.40 HeLa S3, 19 D S.41 MCF7 und 24 H S.48 MEFs). Diese korrelierte zudem mit der Induktion des programmierten Zelltodes (siehe nächstes Kapitel). Eine hTopoI-Schadensantwort kann demzufolge auch ohne primäre DNA-Schädigung induziert werden. Da im Zuge der Apoptose vermehrt reaktive Sauerstoffspezies aus dem Mitochondrium freigesetzt werden, könnten diese jedoch sekundär zu einer oxidativen Schädigung der DNA geführt haben. Um auszuschließen, dass die detektierte hTopoI-Antwort durch sekundäre DNA-Schäden verursacht wurde, sollte durch Einsatz eines Radikalfängers die Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies minimiert werden. Sordet *et al.* beschreiben in diesem Zusammenhang die effiziente Wirksamkeit von N-Acetylcystein zur Entgiftung von Sauerstoffradikalen, die im Zuge der Apoptoseinduktion durch Arsenik (Sordet et al., 2004c) und Staurosporin (Sordet et al., 2004a) entstehen. Doch auch bei Anwesenheit des Radikalfängers konnte in den vorliegenden Ergebnissen keine Verminderung der Schnittkomplexbildung beobachtet werden (Abbildung 22 A S.45). Unabhängig davon wurden Experimente mit HeLa  $\rho^0$  Zellen durchgeführt, die sich durch das gänzliche Fehlen der mitochondriellen DNA auszeichnen (King and Attardi, 1996). Da alle Proteine der Atmungskette auf der mitochondriellen DNA kodiert sind, besitzt diese Zelllinie keine funktionsfähige Redoxkette. Die Atmungskette, die in der mitochondriellen Membran lokalisiert ist, stellt die

Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle dar (Boveris and Chance, 1973). Zellen ohne mitochondrielle DNA besitzen einen stark verminderten basalen Spiegel an ROS (Hoffmann et al., 2004) und zeigen auch nach Apoptoseinduktion keine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Sordet et al., 2004b). Trotzdem ist eine deutliche hTopoI-Schadensantwort in dieser Zelllinie detektierbar (Abbildung 22 C S.45). Es ist also unwahrscheinlich, dass sekundäre oxidative DNA-Schäden Ursache für die stark ausgeprägte hTopoI-Schadensantwort nach Behandlung mit Colcemid sind. Zur Unterstützung dieser Aussage wäre zusätzlich die direkte Quantifizierung der eingeführten DNA-Läsionen unter verschiedenen Bedingungen vorteilhaft.

Einen weiteren kritischen Punkt stellen die im Zuge der apoptotischen DNA-Fragmentation auftretenden Doppelstrangbrüche dar. *In vitro* Experimente zeigten eine Stabilisierung von hTopoI-Schnittkomplexen auf Oligonukleotiden nach Einführung von Einzelstrangbrüchen (Lebedeva et al., 2006; Pourquier et al., 1997a). Deshalb könnte man vermuten, dass auch Strangbrüche in der zellulären DNA eine hTopoI-Schadensantwort induzieren. Einen ersten Hinweis zur Widerlegung dieser Hypothese geben die MCF7 Zellen. Durch die Abwesenheit der Caspase 3 in dieser Zelllinie (Jänicke et al., 1998), die den Hauptaktivator der apoptotischen DNase darstellt (Wolf et al., 1999), kann keine oligonukleosomale Fragmentation der DNA stattfinden. Dies ist anhand der durchflusszytometrischen Daten nach Apoptoseinduktion mit Colcemid und UVC-Strahlung belegt (Abbildungen 19 B S.41 und 23 B S.46). Trotzdem ist in dieser Zelllinie eine deutliche hTopoI-Schadensantwort detektierbar. Auch die Aktivierung des programmierten Zelltodes durch TNF $\alpha$  über den rezeptorvermittelten Weg führt zu einer starken Schnittkomplexbildung (Abbildung 21 B S.43). Im Gegensatz zu den MCF7 Zellen konnte in der T98G Zelllinie eine deutliche Apoptoseinduktion mit einer starken DNA-Fragmentation nach Exposition mit hohen UVC-Dosen nachgewiesen werden (Abbildung 23 C S.46). Diese Zelllinie induzierte jedoch keine signifikante hTopoI-Schadensantwort, trotz massiver Anhäufung von Strangbrüchen. Dementsprechend ist es unwahrscheinlich, dass die Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe eine Folge der apoptotischen DNA-Fragmentation und den damit verbundenen Strangbrüchen ist. Gleichzeitig belegen die Ergebnisse der T98G Zellen erneut, dass die Anwesenheit von DNA-Schäden per se nicht ausreichend ist, um eine deutliche hTopoI-Schadensantwort zu aktivieren. Damit festigt sich die Hypothese einer Rekrutierung der hTopoI durch Einbindung in zelluläre Signalwege, die sich bereits bei den OGG1- bzw. XPA/D-defizienten Zelllinien andeutete. Interessant wäre nun zu untersuchen, welcher Signalweg in den T98G Zellen beeinträchtigt ist. Diese Erkenntnisse würden weitere aufschlussreiche Hinweise auf die Regulation der hTopoI-Schadensantwort geben.

Ein scheinbar generell wichtiger Faktor für die Einleitung der hTopoI-Schadensantwort ist das Tumorsuppressorprotein p53. Ein erhöhtes p53-Proteinlevel als Antwort auf zellulären Stress ist in der Literatur mehrfach beschrieben (siehe z.B. Meek, 2004) und bestätigte sich auch in den eigenen Experimenten (Colcemid Abb. 18 D S.40, 19 D S.41, 22 C S.45; TNF $\alpha$  Abb. 21 B S.43



und Hypoxie Abb. 25 A S.50). Nach Exposition mit UVC-Strahlung konnte die hTopoI-Schnittkomplexbildung in Zellen mit Wildtyp-p53 detektiert werden, während in p53-defizienten Zellen nach gleicher Behandlung kaum eine hTopoI-Antwort nachweisbar war (Mao et al., 2000a; Rockstroh et al., 2006). Auch SKBR3 Zellen, die ein funktionell inaktives p53 aufgrund einer Punktmutation der Aminosäure 175 besitzen, zeigen keine hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Schädigung mit UV-Licht (Mao et al., 2000a). T98G Zellen besitzen ebenfalls eine p53-Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin an Position 237 führt (Van Meir et al., 1994). Die Mutation des potentiellen Signalfaktors p53 könnte somit Ursache für das Ausbleiben einer hTopoI-Schadensantwort in dieser Zelllinie sein. p53-Mutationen resultieren jedoch nicht immer in einer Unterdrückung der hTopoI-Schnittkomplexbildung. Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe deuten auf einen differenzierten Einfluss verschiedener p53-Mutationen auf die hTopoI-Schadensantwort hin (unveröffentlichte Daten, Diplomarbeit Astrid Kleinert). Eine Abhängigkeit der Interaktion zwischen p53 und hTopoI vom zellulären p53-Status ist bereits in der Literatur beschrieben (Gobert et al., 1999). Dabei konnte in Zelllinien mit Wildtyp-p53 eine räumlich und zeitlich streng regulierte Wechselwirkung beobachtet werden, die als Antwort auf genotoxischen Stress erfolgt. Im Gegensatz dazu war eine permanente Assoziation beider Proteine in HT29 Zellen (humane Colonkarzinomzelllinie) mit einer Arg273His p53-Mutation nachweisbar. Es wäre deshalb denkbar, dass sich die beschriebene Abhängigkeit der hTopoI-p53-Interaktion auch auf die Ausprägung der hTopoI-Schadensantwort auswirkt. Da nicht nur eine Interaktion des Tumorsuppressorproteins mit der freien hTopoI (Gobert et al., 1996), sondern auch mit dem Schnittkomplex (Mao et al., 2000a) nachgewiesen wurde, könnte sogar eine direkte Rekrutierungsfunktion für p53 postuliert werden. Mutationen, die eine Störung der Bindung beider Proteine nach sich ziehen, könnten dementsprechend auch zu einer verminderten hTopoI-Schadensantwort führen. Die p53-Punktmutationen der SKBR3 und T98G Zelllinie liegen jedoch außerhalb der Bindungsstelle der hTopoI (Aminosäuren 302 bis 321 (Gobert et al., 1999)). Der genaue Mechanismus, in dem der beschriebene Einfluss dieser p53-Mutationen begründet ist, muss noch aufgeklärt werden. Eventuell könnte die Bindung an hTopoI nur eine Voraussetzung für die Aktivierung der Signalkaskade sein, die zur Rekrutierung und Arretierung der hTopoI führt. Folglich wäre es möglich, dass sich auch solche Mutationen negativ auf die hTopoI-Schadensantwort auswirken, die die Interaktion von p53 mit anderen an der Rekrutierungssignalisierung beteiligten Faktoren beeinflussen. Als potentieller Faktor, der bei der Rekrutierung von hTopoI mit p53 zusammenarbeiten könnte, wurde GADD45 erwähnt (Mao et al., 2000a), welcher wiederum die Bindung an Reparaturkomplexe über die Interaktion mit PCNA vermitteln könnte.

p53 ist in vielfältige Signalwege eingebunden, die von DNA-Schäden oder allgemeinen zellulären Stresssituationen aktiviert werden. Unter anderem ist p53 auch bei der Signalisierung der Apoptoseinduktion nach Blockierung der Kernspindel durch Mikrotubuli-interferierende



Agenzien, wie Colcemid, beteiligt (Sablina et al., 2001; Sablina et al., 1998). Für die Aktivierung einer DNA-schadensunabhängigen hTopoI-Antwort könnte p53 demzufolge auch eine wichtige Rolle spielen. Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten einen deutlichen Einfluss des zellulären p53-Status auf die hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Colcemidbehandlung (Rockstroh et al., 2006). In einer Zelllinie mit reprimierbarem Wildtyp-p53 war nach Ausschaltung der p53-Expression ein deutlich verminderter Spiegel an hTopoI-Schnittkomplexen nachzuweisen. Demgegenüber konnte bei konstitutiver Expression des Tumorsuppressorproteins nach analoger Behandlung mit Colcemid eine deutliche hTopoI-Schadensantwort detektiert werden. Folglich wäre denkbar, dass p53 auch in diesem Fall ein Bindeglied zwischen der Detektion des zellulären Stresses und der Auslösung der hTopoI-Schadensantwort ist. Die Untersuchung des Einflusses weiterer Faktoren, die bei der Signalisierung einer inkorrekten Kernspindelassemblierung beteiligt sind, könnte für zukünftige Projekte interessant sein.

Die bisher diskutierten Ergebnisse zum Einfluss des p53-Status auf die Signalisierung der hTopoI-Schnittkomplexbildung deuten auf eine wesentliche Rolle von p53 hin. Dabei war meist eine Korrelation des p53-Proteingehaltes mit der Stärke der Schnittkomplexakkumulation zu beobachten. Dieser Zusammenhang wird jedoch bei den Ergebnissen mit der HeLa S3 Zelllinie durchbrochen. HeLa S3 Zellen zeigen nach Induktion der hTopoI-Schadensantwort stets eine stark ausgeprägte Bildung stabilisierter Schnittkomplexe. Im Kontrast dazu besitzen diese Zellen nur ein geringes p53-Proteinniveau. Aufgrund der Transformation mit dem humanen Papillomavirus wird die virale E6 Ubiquitin-Ligase exprimiert, die einen raschen Abbau des p53-Proteins vermittelt (Scheffner et al., 1993). Trotzdem zeigen Literaturdaten, dass p53 in HeLa Zellen unter Bedingungen von genotoxischem Stress reaktiviert werden kann (Wesierska-Gadek et al., 2002). Auch die eigenen Ergebnisse weisen auf eine Erhöhung des p53-Spiegels in apoptotischen HeLa S3 Zellen hin (Abbildungen 18 S.40 und 22 S.45). Darüber hinaus wäre eine zusätzliche Beteiligung anderer Signalwege bei der Verstärkung der hTopoI-Schnittkomplexbildung in HeLa S3 Zellen denkbar. So könnten z.B. nach Behandlung mit Colcemid p53-unabhängige Wege bei der Detektion und Signalisierung der inkorrekten Spindelassemblierung eine größere Rolle spielen. Die Tatsache, dass auch in p53-defiziente Zellen ein schwache hTopoI-Schadensantwort zu beobachten ist impliziert, dass p53 zwar eine wichtige, aber nicht essentielle Bedeutung für die Bildung stabilisierter Schnittkomplexe hat. Zudem könnte je nach Art der zellulären Schädigung die p53-Abhängigkeit der Signalisierungskaskade variieren.

Zusammenfassend wird vermutet, dass die Funktionsfähigkeit der Mechanismen zur Detektion und Signalisierung des zellulären Status bedeutsam ist, um eine signifikante hTopoI-Antwort zu aktivieren. Durch eine Mutation oder das gänzliche Fehlen wichtiger Faktoren, wie p53, OGG1 oder XPA/D wird der Signalweg zur Rekrutierung der hTopoI beeinträchtigt oder vollständig unterbrochen. Eine anfangs diskutierte Transkriptionsabhängigkeit der hTopoI-Schnittkomplexbildung könnte insofern im Zuge der transkriptionsgekoppelten NER gegeben sein.

Die hTopoI-Schadensantwort ist somit ein regulierter Prozess, der in das zelluläre Signalnetzwerk eingebunden ist. Zudem konnten die Experimente mit Colcemid und  $\text{TNF}\alpha$  verdeutlichen, dass DNA-Schäden keine unbedingte Voraussetzung für die Aktivierung einer hTopoI-Antwort sind. Hingegen können auch zelluläre Stresssituationen zur Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe führen. Die hTopoI-Schadensantwort ist somit vielmehr eine hTopoI-Stressantwort, die im Zuge allgemeiner zellulärer Beeinträchtigung auftritt. Insofern könnte man einen Zusammenhang zwischen der Zellvitalität und dem Auftreten der hTopoI-Schnittkomplexe vermuten. Zudem stellen stabilisierte Schnittkomplexe selbst eine potentielle Gefahr für die Integrität des Genoms und somit das Überleben der Zelle dar, da sie Ausgangspunkte für Rekombinationsereignisse (Søe et al., 2006; Zhu and Schiestl, 2004) sein können und essentielle DNA-metabolische Prozesse stören (Bendixen et al., 1990; Hsiang et al., 1989; Li and Liu, 2001).

Die postulierte Einbindung der hTopoI-Schadensantwort in das zelluläre Signalnetzwerk gibt vielfältige Möglichkeiten zur Regulation der Schnittkomplexbildung und/oder -Entfernung. So würde die direkte Protein-Protein-Interaktion mit Faktoren, wie z.B. p53, eine kontrollierte Rekrutierung der hTopoI zur DNA zulassen. Darüber hinaus könnte eine Modifikation am Protein selbst als zusätzlicher Regulationsmechanismus genutzt werden. Es ist hinreichend bekannt, dass der N-Terminus der hTopoI im Zuge der Apoptose spezifisch durch Caspase 3 abgespalten wird (Samejima et al., 1999). Dieser Mechanismus könnte zu der beobachteten drastischen Akkumulation von stabilisierten hTopoI-Schnittkomplexen in der Apoptose führen, wenn dadurch die hTopoI irreversibel auf der DNA arretiert werden würde. Aus *in vitro* Experimenten ist jedoch bekannt, dass der N-Terminus für die katalytische Aktivität der hTopoI entbehrlich ist (Alsner et al., 1992). Zudem kann in den MCF7 Zellen, in welchen aufgrund des Fehlens der Caspase 3 keine deutliche Degradation der hTopoI nachweisbar ist, eine Akkumulation von Schnittkomplexen detektiert werden. Zusätzliche Untersuchungen (vorläufige Ergebnisse, nicht gezeigt), in denen die aus dem Schnittkomplex gelöste hTopoI im Western-Blot analysiert wurde, konnten ebenfalls keine Degradation der hTopoI im Komplex nachweisen. Die Abspaltung des N-Terminus im Zuge der Apoptose scheint somit kein direkter Mechanismus zur Stabilisierung von hTopoI-Schnittkomplexen zu sein. Posttranslationale Modifikationen sind im Zusammenhang mit der hTopoI-Schadensantwort bisher kaum untersucht worden. In der Literatur existieren nur einige wenige Hinweise auf einen potentiellen Einfluss der Phosphorylierung durch die c-Abl Tyrosinkinase (Yu et al., 2004), einer Sumoylierung (Horie et al., 2002; Mao et al., 2000b) oder Poly(ADP)Ribosylierung (Kasid et al., 1989; Malanga and Althaus, 2004) der hTopoI. Darüber hinaus weisen vorläufige Daten aus der Arbeitsgruppe auf eine negative Regulation der hTopoI-Schadensantwort durch PARP1 bzw. Poly(ADP)Ribosylierung hin (Diplomarbeit Marcel Kramer). Interessante Zusammenhänge könnten sich auch aus den Daten ergeben, die zeigen, dass das Topoisomerase I- und p53-Bindeprotein Topors nicht nur selbst sumoyliert wird (Weger et al., 2003), sondern auch als SUMO E3 Ligase für p53 fungiert (Weger et al., 2005). Die Expression von Topors wird unter Bedingungen von genotoxischem Stress hochreguliert, was über eine

direkte Aktivierung und Stabilisierung von p53 zur Induktion der Apoptose führen kann (Lin et al., 2005). Inwiefern die hTopoI-Schadensantwort im Rahmen dieser Prozesse beteiligt ist oder beeinflusst werden könnte, wären interessante Fragestellungen für zukünftige Projekte.

## 5.2. Welche Funktion haben hTopoI-Schnittkomplexe in der Zelle?

Seit der ersten Beobachtung stabilisierter Schnittkomplexe in UV-bestrahlten Zellen (Rosenstein et al., 1997; Subramanian et al., 1998), konnte eine hTopoI-Schadensantwort nach Behandlung von Kulturzellen mit diversen DNA-schädigenden Agenzien nachgewiesen werden. So war nach Einbau von Nukleosid-Analoga wie AraC (Pourquier et al., 2000) oder Gemcitabine (Pourquier et al., 2002) eine hTopoI-Schnittkomplexbildung zu beobachten. Dabei wurde bereits ein Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung dieser in der Chemotherapie eingesetzten Substanzen diskutiert. Auch nachdem Kulturzellen Benzo[a]pyren (Pommier et al., 2000a) oder alkylierenden Agenzien wie MNNG ausgesetzt waren (Pourquier et al., 2001), konnte eine hTopoI-Schadensantwort *in vivo* detektiert werden. Hier erreichte das Schnittkomplexlevel etwa 30 min nach Behandlung mit MNNG ein Maximum, während nach 3 h ein leichter Rückgang zu verzeichnen war. Die Exposition mit UVB-Strahlung führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion von hTopoI-Schnittkomplexen (Subramanian et al., 1998). Dabei wurde die hTopoI-Schadensantwort während der ersten 5 h nach Bestrahlung verfolgt und ein Anstieg der arretierten hTopoI-Moleküle festgestellt. Wie entwickelt sich das hTopoI-Schnittkomplexlevel nach dieser Zeit? Können die hTopoI-Schnittkomplexe in jedem Fall wieder revertiert werden oder ist eine Abhängigkeit vom Ausmaß des induzierten Schadens gegeben? Eine genauere Untersuchung der Langzeitkinetik der Schnittkomplexbildung nach Bestrahlung mit UVC-Licht zeigte je nach applizierter Strahlungsdosis eine unterschiedlich ausgeprägte hTopoI-Schadensantwort (Abbildungen 14 A S.34 und 15 A S.35). Bei Exposition mit einer geringen Strahlungsdosis, die nur einen moderaten Einfluss auf die Zellvitalität hatte, konnte eine transiente hTopoI-Antwort nachgewiesen werden. Nach Erreichen eines Maximums 3-6 h nach Bestrahlung war ein Rückgang des Schnittkomplexlevels auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle innerhalb von 24 h zu beobachten. Analoge Ergebnisse wurden nach Einführung von oxidativen DNA-Schäden erhalten. So konnte sowohl in HeLa S3 Zellen (Abbildung 17 I S.38), als auch in den Wildtyp-Mausfibroblasten (Abbildung 24 F S.48) eine transiente hTopoI-Schadensantwort bei geringem oxidativen Stress detektiert werden. Unter Bedingungen, bei denen die Zelle den induzierten DNA-Schaden reparieren kann, scheint demzufolge nur eine schwache hTopoI-Antwort induziert zu werden. Die stabilisierten Schnittkomplexe scheinen unter diesen Bedingungen ebenfalls wieder entfernt werden zu können. In diesem Zusammenhang wäre eine Funktion der hTopoI-Schnittkomplexe zur Blockierung von Transkription oder Replikation bei geschädigter DNA denkbar. Somit würde das Kopieren einer fehlerhaften DNA-Matrize und das Festschreiben von Mutationen unterbunden werden, bis die fehlerhafte Stelle repariert werden konnte. Dass die Anwesenheit eines hTopoI-Schnittkomplexes zum Abbruch der

Transkription führen kann, ist bereits aus der Literatur bekannt (Bendixen et al., 1990; Li and Liu, 2001). In diesem Zusammenhang würde die hTopoI-Antwort der Erhaltung der genomischen Integrität dienen und somit das Überleben der Zelle gewährleisten, sofern der induzierte Schaden repariert werden konnte.

In scheinbarem Gegensatz dazu stehen zunächst die Erkenntnisse, die nach Induktion von hTopoI-Schnittkomplexen mit Camptothecin aus der Literatur hinreichend bekannt sind. Hier konnte eine Entstehung von Doppelstrangbrüchen bei Kollision mit Replikationskomplexen beobachtet werden, die zum Absterben der Zelle führen (Hsiang et al., 1989). Auf diesem Mechanismus beruht die gute Wirksamkeit von Camptothecin-Analoga in der Chemotherapie. Ein Zusammenhang zur Apoptoseinduktion konnte jedoch auch bei der hTopoI-Schadensantwort nach Exposition mit hohen UVC-Strahlungsdosen festgestellt werden. Hier war eine wesentlich stärkere Bildung stabilisierter Schnittkomplexe nachweisbar, die über einen langen Zeitraum persistieren (Abbildungen 14 A S.34 und 15 A S.35). Analoge Ergebnisse wurden auch nach Einführung einer großen Anzahl oxidativer Läsionen erhalten (Abbildung 17 I S.38). Demzufolge scheinen die Ausprägung der hTopoI-Schadensantwort sowie die zellulären Folgen abhängig vom Ausmaß der Schädigung zu sein. Bei einem geringen Schadensmaß kann sowohl die DNA-Läsion als auch der hTopoI-Schnittkomplex erfolgreich repariert bzw. entfernt werden. Übersteigt das Ausmaß der Schäden die Reparaturkapazität der Zelle, ist die Aktivierung einer starken hTopoI-Schnittkomplexbildung mit der Apoptoseinduktion gekoppelt. Die Zusammenfassung aller Hinweise aus der Literatur deutet auf das Vorhandensein zweier gegenläufiger Mechanismen zur Bildung und Reparatur von hTopoI-Schnittkomplexen hin. Der Vorrang der einen oder anderen Reaktion könnte durch Signalwege gesteuert werden, die den zellulären Schadens-Status detektieren. In diesem Zusammenhang würde sich auch die postulierte Einbindung der hTopoI-Schadensantwort in das Netzwerk zellulärer Signalwege bestätigen. Die hTopoI-Schnittkomplexe könnten somit eine Rolle bei der Entscheidung zwischen Schadensreparatur und Induktion des programmierten Zelltodes spielen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die beobachtete hTopoI-Antwort während DNA-Reparaturvorgängen bzw. im Zuge der Apoptose zwei unabhängige Prozesse sind. Interessante Daten könnte dahingehend die Untersuchung der zeitlichen Korrelation der hTopoI-Schnittkomplexbildung mit dem Prozess der DNA-Reparatur liefern. Auch die direkte Detektion der induzierten DNA-Schäden wäre dabei und ebenso generell für weitergehende Untersuchungen hilfreich. Das Maximum der Schnittkomplexakkumulation 3 h (MCF7) bzw. 6h (HeLa S3) nach Bestrahlung mit geringen UVC-Dosen, könnte zeitlich durchaus in die aktive Reparaturphase fallen (Abbildungen 14 A S.34 und 15 A S.35). Hingegen wird das Maximum der hTopoI-Schnittkomplexbildung nach Einführung oxidativer DNA-Läsionen, sowohl in den HeLa S3 als auch in den Wildtyp MEF Zellen, erst sehr spät (~16 h) nach Behandlung erreicht (Abbildungen 17 I S.38 und 24 F S.48). Dafür geben Literaturdaten, die nach 16 h eine quasi vollständige Reparatur der durch Ro19-8022-induzierten oxidativen Schäden in den Wildtyp MEF Zellen beschreiben, einen ersten Anhaltspunkt (Klungland et al., 1999). Eine exakte

Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Ergebnissen ist jedoch aufgrund unterschiedlicher Reaktionsbedingungen nicht gegeben.

Bei näherer Betrachtung der Zeitabhängigkeit der hTopoI-Schnittkomplexbildung unter stark schädigenden Bedingungen, ist die hTopoI-Schadensantwort gleichzeitig mit prominenten Apoptosemarkern wie der PARP1 Spaltung und der vermehrten Entstehung von subG1 Zellen detektierbar. Besonders gut kann dies in [Abbildung 18 \(S.40\)](#) nach Apoptoseinduktion mit Colcemid verfolgt werden. Es ist eine deutliche Korrelation einer erhöhten Schnittkomplexakkumulation mit dem Nachweis von Apoptose bzw. mit der Verminderung der Zellvitalität zu beobachten. Die Separation von apoptotischen und vitalen Zellen einer UV-bestrahlten Population bestätigte zusätzlich, dass die detektierte starke Schnittkomplexbildung vornehmlich in den sterbenden Zellen zu beobachten ist ([Abbildung 14 E S.34 und 15 C S.35](#)). Ist folglich von einer ähnlichen apoptogenen Wirkung der im Zuge der hTopoI-Schadensantwort gebildeten Schnittkomplexe wie bei der Stabilisierung durch Topoisomerase-Toxine auszugehen? Ein Hinweis auf einen potentiellen Zusammenhang der hTopoI-Antwort mit der Apoptose findet sich schon in der Publikation von Mao *et al.* ([Mao et al., 2000a](#)). Hier wurde, begründet durch die beschriebene Beteiligung von p53 an der hTopoI-Schadensantwort, eine Rolle bei der Entfernung geschädigter Zellen aus dem Organismus diskutiert. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls über eine Beteiligung der hTopoI-Schnittkomplexe an der zytotoxischen Wirkung verschiedener Substanzen wie AraC ([Pourquier et al., 2000](#)), Gemcitabine ([Pourquier et al., 2002](#)) oder Wasserstoffperoxid ([Daroui et al., 2004](#)) spekuliert.

In der Literatur finden sich zudem einige Hinweise auf eine Korrelation des zellulären Topoisomerase I-Expressionslevels mit der Sensitivität gegenüber genotoxischen Substanzen. In Topoisomerase I-defizienten Hefen konnte durch ektopische Expression des Proteins die Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid wiederhergestellt werden. Auch eine spezielle murine Leukämiezelllinie, bei der keine TopoI-Expression detektierbar ist, zeigte gegenüber Wasserstoffperoxid eine geringere Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp ([Daroui et al., 2004](#)). Bei Herabregulation des zellulären hTopoI-Gehaltes in humanen MCF7 und HCT116 Zellen war ebenfalls eine Resistenz gegenüber 4-Nitroquinoline-1-Oxide (4NQO) festzustellen ([Miao et al., 2006](#)). Eine erhöhte Sensitivität gegenüber genotoxischen Einflüssen war wiederum nachzuweisen, wenn Topoisomerase I in Hefen überexprimiert wurde ([Nitiss et al., 2001](#); [Pourquier et al., 2001](#)). Diese Verstärkung der Sensitivität konnte nicht beobachtet werden, wenn im gleichen Hefestamm ein katalytisch inaktives Enzym überexprimiert wurde ([Nitiss et al., 2001](#)). Insofern könnte der beobachtete Einfluss des Topoisomerase I-Gehaltes auf die zelluläre Sensitivität, durch die differenzierte Bildung von hTopoI-Schnittkomplexen begründet sein. Eine aktuelle Publikation zeigt, dass eine humane Camptothecin-hypersensitive Zelllinie ebenfalls eine gesteigerte Sensitivität gegenüber 4NQO aufweist, wobei gleichzeitig eine verstärkte hTopoI-Schadensantwort im Vergleich zur Stammzelllinie detektiert werden konnte ([Miao et al., 2006](#)).

Frühere Studien beschrieben zwar ebenfalls eine erhöhte Resistenz von CPT-resistenten Zellen gegenüber Chemotherapeutika wie AraC (Pourquier et al., 2000) und Gemcitabine (Pourquier et al., 2002), aber ein Zusammenhang mit dem TopoI-Schnittkomplexlevel wurde nicht gezeigt. Das Ergebnis von Miao et al. (Miao et al., 2006) ermöglicht also erstmals die Korrelation einer erhöhten zellulären Sensitivität mit einer verstärkten hTopoI-Schadensantwort.

Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der Nachweismethoden zur Detektion von Schnittkomplexen (ICT Assay) und Apoptose (Western-Blot, Durchflusszytometrie) ist eine Aussage über die Reihenfolge der Prozesse nur bedingt möglich. Es bleibt also noch zu klären, ob die hTopoI-Schnittkomplexe eine Ursache oder Folge der Apoptoseinduktion sind. Die Zusammenfassung von Literaturdaten ermöglicht jedoch die Spekulation über den potentiellen Ablauf der Prozesse in der Zelle. Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits eine mögliche Funktion der hTopoI-Schadensantwort bei der Entscheidung zwischen DNA-Reparatur und Induktion des Zelltodes erwähnt. Somit wäre eine ursächliche Rolle bei der Apoptoseinduktion naheliegend. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Schnittkomplexbildung mit dem Ausmaß der zellulären Schädigung korreliert. Mit Daten aus der Literatur kann diese Aussage zusätzlich auf die allgemeine zelluläre Sensitivität ausgedehnt werden (Miao et al., 2006). Bei geringer Schädigung können die wenigen gebildeten Schnittkomplexe scheinbar effizient wieder entfernt werden. Ist jedoch die Bildung der Schnittkomplexe stärker als der Mechanismus zur Entfernung, könnte eine drastische Schnittkomplexakkumulation ein Induktor für Apoptose sein. Dabei wäre die Überschreitung eines kritischen Niveaus entscheidend für die zellulären Folgen der Schnittkomplexbildung. Die Quantifizierung der hTopoI-Schnittkomplexe in apoptotischen Zellen kann dabei als erster Anhaltspunkt dienen. Nach 40 h Behandlung mit Colcemid konnten in HeLa S3 Zellen etwa 8 hTopoI-Schnittkomplexe pro Megabasenpaar detektiert werden (Abbildung 20 S.42). Gleichzeitig ist sehr schwach die beginnende PARP1 Spaltung zu beobachten (Abbildung 18 D S.40). Dieser Spiegel an Schnittkomplexen geht folglich schon mit der Apoptoseinduktion einher. Das kritische Niveau, bis zu welchem die hTopoI-Schnittkomplexe noch entfernt werden können, scheint somit unter diesem Wert zu liegen. Eine zusätzliche Quantifizierung der Schnittkomplexe unter nicht-apoptotischen Bedingungen ist jedoch nötig, um die Anzahl der noch tolerierbaren Schnittkomplexe genauer einzugrenzen. Zudem könnte z.B. ein Vergleich mit der Anzahl induzierter DNA-Schäden die Betrachtung abrunden.

Aus Untersuchungen mit Camptothecin wird geschlussfolgert, dass die Einführung von Doppelstrangbrüchen bei Kollision mit Replikationskomplexen ursächlich für die Auslösung des programmierten Zelltodes ist (Hsiang et al., 1989; Strumberg et al., 2000). Folglich kann von einer S-Phase-abhängigen Wirkung des Camptothecins gesprochen werden. Die Aktivierung des programmierten Zelltodes im Zuge der hTopoI-Schadensantwort scheint hingegen nicht auf diesem Mechanismus zu beruhen. So zeigten die Colcemidexperimente eine deutliche



Apoptoseinduktion in der M-Phase bzw. beim Wiedereintritt in die G1-Phase des Zellzyklus (Abbildung 18 S.40). Somit ist hier ein anderer Mechanismus zur Aktivierung der Apoptosekaskade anzunehmen. Woo *et al.* publizierten in diesem Zusammenhang interessante Daten, die durch Einsatz einer speziellen hTopoI-Mutante erhalten wurden, bei der ein chemisch induzierbares Schließen der hTopoI Ringklemmenstruktur möglich ist. Überraschenderweise konnte dabei beobachtet werden, dass das Schließen der hTopoI Klemme auch dann zu einer drastischen Verminderung der Zellvitalität führt, wenn gleichzeitig das Ausführen der Schnittreaktion blockiert wird. Diese Toxizität kann somit nicht mit dem Einführen von Strangbrüchen begründet werden. In Übereinstimmung damit, war die gezeigte zytotoxische Wirkung auch unabhängig von der S-Phase (Woo *et al.*, 2003).

Die Diskussion der hTopoI-Schadensantwort in der Literatur reicht bis zu einer aktiven Rolle des Schnittkomplexes als „Nuklease“ bei der apoptotischen DNA-Degradation. Nach Auslösung des Zelltodes mittels Arsenik und Staurosporin konnte bei Herabregulation des hTopoI Proteingehaltes durch siRNA eine verminderte Fragmentierung der DNA detektiert werden (Sordet *et al.*, 2004a; Sordet *et al.*, 2004c). HTopoI-Schnittkomplexe stellen jedoch zunächst nur Protein-gebundene Einzelstrangbrüche dar, die per se noch keine Fragmentierung der DNA verursachen können. Erst die Umwandlung in Doppelstrangbrüche würde in einer effektiven Degradation resultieren. Dies wäre z.B. durch zwei hTopoI-Schnittkomplexe auf gegenüberliegenden DNA-Strängen in unmittelbarer Nähe zueinander möglich. Andererseits könnte auch unter Beteiligung einer Endonuklease der zweite Strang gespalten werden. MCF7 Zellen zeigen aufgrund des Fehlens der Caspase 3 keine oligonukleosomale Fragmentation der DNA (Abbildung 23 S.46) (Jänicke *et al.*, 1998). Trotzdem ist hier eine deutliche hTopoI-Schadensantwort nachzuweisen (Abbildungen 23 S.46, 21 S.43, 19 S.41, 15 S.35). Eine direkte Rolle der hTopoI-Schnittkomplexe bei der oligonukleosomalen DNA-Fragmentation erscheint somit eher unwahrscheinlich. Unabhängig von dieser sehr fortgeschrittenen Degradation der DNA in 180 Basenpaar-Fragmente, wird in der Literatur das Vorhandensein eines weiteren Mechanismus diskutiert, der eine hochmolekulare DNA-Fragmentation im Zuge der Apoptose verursacht. Diese scheint kein Vorläufer der oligonukleosomalen Degradation zu sein, sondern ein eigenständiger, unabhängiger Weg. Über die an diesem Prozess beteiligten Proteine herrscht noch keine endgültige Klarheit. Eine Rolle von Topoisomerase II, Endonuklease G oder dem Apoptose-Induzierenden-Faktor (AIF) wird kontrovers diskutiert (Nagata *et al.*, 2003; Solovyan *et al.*, 2002; Susin *et al.*, 2000). Für die Größe der entstehenden Fragmente finden sich in der Literatur Angaben von etwa 50-300 Kilobasenpaaren (Oberhammer *et al.*, 1993). Anhand der Quantifizierung der gebildeten hTopoI-Schnittkomplexe nach Colcemidbehandlung, ist in spätapoptotischen Zellen etwa ein Schnittkomplex alle 11-33 Kilobasenpaare zu erwarten (Abbildung 20 B S.42). Somit wäre eine Beteiligung der hTopoI-Schnittkomplexe an dieser hochmolekularen DNA-Degradation vorstellbar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Caspase 3 zu einer drastischen Reduktion des hTopoI-Schnittkomplexlevels nach



Apoptoseinduktion mit Arsenik und Staurosporin führt (Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004c). Die Effektor-Caspase 3 stellt eine wichtige Protease bei degenerativen Prozessen in einem eher fortgeschrittenen Stadium der Apoptose dar. Die Abhängigkeit einer starken Schnittkomplexbildung von der Aktivität der Caspase 3 und die potentielle Rolle als Nuklease würde die hTopoI-Schadensantwort somit eher als Folge der Apoptoseinduktion einordnen. Die Detektion einer hTopoI-Schadensantwort in Caspase 3-defizienten MCF7 Zellen (Abbildungen 23 S.46, 21 S.43, 19 S.41, 15 S.35) widerspricht jedoch einer essentiellen Funktion der Caspase 3-Aktivität bei der Schnittkomplexbildung. Vorstellbar wäre hingegen die Auslösung eines Verstärkungsmechanismus der hTopoI-Schnittkomplexbildung durch die aktivierte Caspase 3 (Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004c). Dies könnte zudem eine mögliche Ursache für die im Vergleich zur HeLa S3 Zelllinie schwächere hTopoI-Schadensantwort in den Caspase 3-defizienten MCF7 Zellen darstellen.

Die endgültige Klärung der zellulären Funktion der hTopoI-Schadensantwort bzw. ihrer Rolle in der Apoptose bedarf somit weiterer intensiver Untersuchungen. Die nähere Analyse der Vitalität und der Ausprägung apoptotischer Merkmale in Zelllinien mit herabreguliertem hTopoI-Gehalt könnten dahingehend erste Anhaltspunkte liefern. Dabei ist aber zu beachten, dass durch ein generell verringertes hTopoI-Proteinniveau auch die essentielle Funktion des Enzyms bei der Relaxierung von Superspiralisierungen gestört wird. Dementsprechend ist eine differenzierte Betrachtung der Folgen beider Prozesse sehr schwierig, aber unerlässlich für realistische Schlussfolgerungen. Ein optimales Werkzeug wäre die Erzeugung einer hTopoI-Mutante, bei der nur die Bildung stabilisierter Schnittkomplexe, nicht aber die Relaxierungsfunktion beeinträchtigt ist. Dazu wäre jedoch eine genaue Kenntnis des Mechanismus der Schnittkomplexstabilisierung im Zuge der hTopoI-Schadensantwort nötig. Dass die hTopoI-Schadensantwort im physiologischen Zusammenhang durchaus von Bedeutung sein könnte, deuten die Daten in Abbildung 25 (S.50) an. Die gezeigte Detektierbarkeit einer hTopoI-Schadensantwort bei Reoxygenierung nach Hypoxie könnte auf eine potentielle Beteiligung der Schnittkomplexbildung bei der Tumorprogression hinweisen. Vorläufige Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe weisen zudem eine Bildung stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe nach *ex vivo* Bestrahlung von Lymphozyten aus gesunden Probanden nach (nicht veröffentlichte Daten). Ein nächster Schritt könnte nun die Untersuchung des Auftretens einer hTopoI-Schadensantwort in Blutzellen von Patienten nach einer Bestrahlungstherapie oder während einer Chemotherapie sein.

## 6. Zusammenfassung

Zur Erhaltung der Integrität des Erbmateriels besitzen Zellen eine Vielzahl an Mechanismen um auf DNA-schädigende Einflüsse zu reagieren. Je nach Art und Ausmaß der Schädigung werden DNA-Reparatursysteme aktiviert oder die Apoptose eingeleitet, um einer Entartung der Zelle entgegenzuwirken. In den vergangenen Jahren verdichteten sich die Hinweise auf die Beteiligung der eukaryotischen Topoisomerase I an einem bisher erst wenig charakterisierten Mechanismus der zellulären Stressantwort.

Die humane Topoisomerase I (hTopoI) ist ein essentielles nukleäres Enzym, welches durch die Regulation des topologischen Zustandes der DNA die Funktionsfähigkeit grundlegender Prozesse des DNA-Metabolismus gewährleistet. Im Zuge des katalytischen Zyklus kommt es zur Ausbildung eines kovalenten Komplexes zwischen der hTopoI und dem geschnittenen DNA-Einzelstrang. Dieses als „Schnittkomplex“ bezeichnete Intermediat ist nur sehr kurzlebig und wird bei Religation des Einzelstrangbruchs revertiert. Spezifische hTopoI-Toxine können diesen Schnittkomplex binden und durch Verhinderung des Religationsschrittes stabilisieren. Die bei der Kollision mit Replikationskomplexen entstehenden Doppelstrangbrüche führen zur Auslösung des apoptotischen Zelltodes. Dieser Mechanismus liegt der guten Wirksamkeit und dem erfolgreichen Einsatz von Camptothecin-Analoga in der Krebstherapie zu Grunde.

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass stabilisierte hTopoI-Schnittkomplexe auch nach Einführung von DNA-Läsionen in Kulturzellen detektiert werden können. Die Bildung solcher stabilisierter hTopoI-Schnittkomplexe *in vivo* wird als „hTopoI-Schadensantwort“ bezeichnet. Anhand von *in vitro* Experimenten wurde ein Mechanismus für die hTopoI-Schadensantwort postuliert, der die direkte Erkennung der DNA-Läsion durch die hTopoI impliziert. Über die zelluläre Rolle der hTopoI-Schadensantwort und ihre Regulation ist erst wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass ein geringes Niveau an DNA-Schädigung *in vivo* zu einer transienten hTopoI-Schadensantwort führt, die von der Funktionsfähigkeit des entsprechenden DNA-Reparaturweges abhängig zu sein scheint. Im Gegensatz dazu korreliert ein hohes und persistentes Schnittkomplexlevel mit dem Auftreten der Apoptose. Dieser Zusammenhang konnte nach Apoptoseinduktion durch starke DNA-Schädigung, aber auch DNA-schadensunabhängig gezeigt werden. Somit könnte ein hohes und persistentes Schnittkomplexlevel ein generelles Merkmal apoptotischer Zellen unabhängig von der Art des Apoptosestimulus sein. Weiterhin ergibt sich daraus, dass die hTopoI-Schadensantwort nicht nur nach DNA-Schädigung ausgelöst wird, sondern vielmehr eine generelle zelluläre Stressantwort darstellt. Hieraus kann auch ein neues Modell für den Mechanismus der Schnittkomplexbildung abgeleitet werden, bei dem die hTopoI den DNA-Schaden nicht direkt erkennt, sondern im Zuge zellulärer Signalwege rekrutiert wird. In diese Signalwege involvierte Proteine könnten je nach Art der zellulären Stresssituation, Faktoren zugehöriger DNA-Reparaturwege oder andere

Sensorproteine, wie z.B. p53 sein. Die Funktionsfähigkeit der entsprechenden schadendetektierenden und signalisierenden Mechanismen ist somit Voraussetzung für die effiziente Aktivierung der hTopoI-Schadensantwort.

Die Tatsache, dass das Ausmaß der hTopoI-Antwort vom Grad der zellulären Schädigung abhängig ist und ein hohes und persistentes Schnittkomplexlevel mit der Induktion des Zelltodes korreliert, könnte auf eine Rolle bei der Entscheidung zwischen DNA-Reparatur und Apoptoseauslösung unter zellulären Stressbedingungen hindeuten. Eine erste Quantifizierung der stabilisierten Schnittkomplexe weist dabei auf ein von der Zelle tolerierbares Niveau von weniger als 8 hTopoI-Schnittkomplexen pro Megabasenpaar hin. In spätapoptotischen Zellen steigt die Anzahl der stabilisierten Schnittkomplexe bis auf 87 pro Megabasenpaar an, was bei Gleichverteilung etwa einem Komplex pro 11 Kilobasenpaare entsprechen würde. Demzufolge wäre auch eine Beteiligung der hTopoI-Antwort an der hochmolekularen DNA-Fragmentation im Zuge der Apoptose vorstellbar. Die endgültige Klärung der zellulären Funktion der hTopoI-Schadensantwort bzw. ihrer Rolle in der Apoptose bedarf jedoch weiterer intensiver Untersuchungen.

*"Die Wissenschaft nötigt uns,  
den Glauben an einfache Kausalitäten aufzugeben."*

Friedrich Nietzsche (1844-1900)  
dt. Philosoph und klassischer Philologe

## 7. Literaturverzeichnis

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E. and Krokan, H.E. (2003) Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, **421**, 859-863.
- Alsner, J., Svejstrup, J.Q., Kjeldsen, E., Sorensen, B.S. and Westergaard, O. (1992) Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem*, **267**, 12408-12411.
- Andersen, A.H., Gocke, E., Bonven, B.J., Nielsen, O.F. and Westergaard, O. (1985) Topoisomerase I has a strong binding preference for a conserved hexadecameric sequence in the promoter region of the rRNA gene from *Tetrahymena pyriformis*. *Nucleic Acids Res*, **13**, 1543-1557.
- Andersen, F.F., Tange, T.O., Sinnathamby, T., Olesen, J.R., Andersen, K.E., Westergaard, O., Kjems, J. and Knudsen, B.R. (2002) The RNA splicing factor ASF/SF2 inhibits human topoisomerase I mediated DNA relaxation. *J Mol Biol*, **322**, 677-686.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, **6**, 593-597.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Baker, S.D., Wadkins, R.M., Stewart, C.F., Beck, W.T. and Danks, M.K. (1995) Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry*, **19**, 134-145.
- Barja, G. (2004) Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev Camb Philos Soc*, **79**, 235-251.
- Barthelmes, H.U., Habermeyer, M., Christensen, M.O., Mielke, C., Interthal, H., Pouliot, J.J., Boege, F. and Marko, D. (2004) TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *J Biol Chem*.
- Baumann, C., Boehden, G.S., Burkle, A. and Wiesmuller, L. (2006) Poly(ADP-RIBOSE) polymerase-1 (Parp-1) antagonizes topoisomerase I-dependent recombination stimulation by P53. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1036-1049.
- Been, M.D., Burgess, R.R. and Champoux, J.J. (1984) Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA. *Nucleic Acids Res*, **12**, 3097-3114.
- Begley, T.J. and Samson, L.D. (2004) Network responses to DNA damaging agents. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1123-1132.
- Bendixen, C., Thomsen, B., Alsner, J. and Westergaard, O. (1990) Camptothecin stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription. *Biochemistry*, **29**.
- Blons, H., Radicella, J.P., Laccourreye, O., Brasnu, D., Beaune, P., Boiteux, S. and Laurent-Puig, P. (1999) Frequent allelic loss at chromosome 3p distinct from genetic alterations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene in head and neck cancer. *Mol Carcinog*, **26**, 254-260.
- Boehden, G.S., Restle, A., Marschalek, R., Stocking, C. and Wiesmuller, L. (2004) Recombination at chromosomal sequences involved in leukaemogenic rearrangements is differentially regulated by p53. *Carcinogenesis*, **25**, 1305-1313.
- Boothman, D.A., Fukunaga, N. and Wang, M. (1994) Down-regulation of topoisomerase I in mammalian cells following ionizing radiation. *Cancer Res*, **54**, 4618-4626.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, **134**, 707-716.

- Bowman, K.J., Newell, D.R., Calvert, A.H. and Curtin, N.J. (2001) Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *Br J Cancer*, **84**, 106-112.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bronstein, I.B., Vorobyev, S., Timofeev, A., Jolles, C.J., Alder, S.L. and Holden, J.A. (1996) Elevations of DNA topoisomerase I catalytic activity and immunoprotein in human malignancies. *Oncol Res*, **8**, 17-25.
- Brown, J.K. and Bick, Y.A. (1986) Comparison of cellular effects of phomopsin and colcemid in Chinese hamster cells in vitro. *Cytobios*, **46**, 78-91.
- Bürkle, A. (2005) Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *Febs J*, **272**, 4576-4589.
- Camilloni, G., Di Martino, E., Di Mauro, E. and Caserta, M. (1989) Regulation of the function of eukaryotic DNA topoisomerase I: topological conditions for inactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3080-3084.
- Cardellini, E. and Durban, E. (1993) Phosphorylation of human topoisomerase I by protein kinase C in vitro and in phorbol 12-myristate 13-acetate-activated HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *Biochem J*, **291** ( Pt 1), 303-307.
- Cardellini, E., Felici, F. and Gianfranceschi, G.L. (2004) Identification of peptides mimicking the ligands of proteins phosphorylated by protein kinase CK2. *Peptides*, **25**, 191-197.
- Carey, J.F., Schultz, S.J., Sisson, L., Fazio, T.G. and Champoux, J.J. (2003) DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein. *PNAS*, **100**, 5640-5645.
- Castano, I.B., Brzoska, P.M., Sadoff, B.U., Chen, H. and Christman, M.F. (1996) Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **10**, 2564-2576.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. and Kroemer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, **23**, 2825-2837.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
- Champoux, J.J. and Dulbecco, R. (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 143-146.
- Chang, H.Y. and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 821-846.
- Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N. and Shuman, S. (1998) Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell*, **92**, 841-850.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem*, **267**, 166-172.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B. and Boiteux, S. (1998) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene*, **16**, 3083-3086.
- Christensen, M.O., Barthelmes, H.U., Boege, F. and Mielke, C. (2002) The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes. *J Biol Chem*, **277**, 35932-35938.
- Christensen, M.O., Krokowski, R.M., Barthelmes, H.U., Hock, R., Boege, F. and Mielke, C. (2004) Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem*, **279**, 21873-21882.

- Chuang, N.N., Lin, C.L. and Chen, H.K. (1996) Modification of DNA topoisomerase I enzymatic activity with phosphotyrosyl protein phosphatase and alkaline phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea:Decapoda). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **114**, 145-151.
- Corbett, A.H. and Osheroff, N. (1993) When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol*, **6**, 585-597.
- Daroui, P., Desai, S.D., Li, T.K., Liu, A.A. and Liu, L.F. (2004) Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem*, **279**, 14587-14594.
- D'Arpa, P. and Liu, L.F. (1995) Cell cycle-specific and transcription-related phosphorylation of mammalian topoisomerase I. *Exp Cell Res*, **217**, 125-131.
- Davies, D.R., Interthal, H., Champoux, J.J. and Hol, W.G. (2003) Crystal structure of a transition state mimic for Tdp1 assembled from vanadate, DNA, and a topoisomerase I-derived peptide. *Chem Biol*, **10**, 139-147.
- De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F. and Balansky, R.M. (2001) Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, **22**, 999-1013.
- Debethune, L., Kohlhaagen, G., Grandas, A. and Pommier, Y. (2002) Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1198-1204.
- Desai, S.D., Li, T.K., Rodriguez-Bauman, A., Rubin, E.H. and Liu, L.F. (2001) Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res*, **61**, 5926-5932.
- Desai, S.D., Liu, L.F., Vazquez-Abad, D. and D'Arpa, P. (1997) Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem*, **272**, 24159-24164.
- Dianov, G.L., Souza-Pinto, N., Nyaga, S.G., Thybo, T., Stevnsner, T. and Bohr, V.A. (2001) Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**, 285-297.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T. and Sedgwick, B. (2002) Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16660-16665.
- Durban, E., Goodenough, M., Mills, J. and Busch, H. (1985) Topoisomerase I phosphorylation in vitro and in rapidly growing Novikoff hepatoma cells. *Embo J*, **4**, 2921-2926.
- El-Khamisy, S.F., Saifi, G.M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J.R. and Caldecott, K.W. (2005) Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature*, **434**, 108-113.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
- Ferro, A.M., Higgins, N.P. and Olivera, B.M. (1983) Poly(ADP-ribosylation) of a DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, **258**, 6000-6003.
- Ferro, A.M., McElwain, M.C. and Olivera, B.M. (1984a) Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I: a nuclear response to DNA-strand interruptions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **49**, 683-690.
- Ferro, A.M. and Olivera, B.M. (1984) Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J Biol Chem*, **259**, 547-554.
- Ferro, A.M., Thompson, L.H. and Olivera, B.M. (1984b) Poly (ADP-ribosylation) and DNA topoisomerase I in different cell lines. *Adv Exp Med Biol*, **179**, 441-447.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology, Washington,.
- Froelich-Ammon, S.J. and Osheroff, N. (1995) Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem*, **270**, 21429-21432.



- Frohlich, K.U. and Madeo, F. (2000) Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett*, **473**, 6-9.
- Garcia-Carbonero, R. and Supko, J.G. (2002) Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clin Cancer Res*, **8**, 641-661.
- Gaur, U. and Aggarwal, B.B. (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*, **66**, 1403-1408.
- Geng, L., Xin, W., Huang, D.W. and Feng, G. (2006) A universal cloning vector using vaccinia topoisomerase I. *Mol Biotechnol*, **33**, 23-28.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F. and Pelicci, P.G. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, **122**, 221-233.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K. and Riou, J.F. (1996) Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry*, **35**, 5778-5786.
- Gobert, C., Skladanowski, A. and Larsen, A.K. (1999) The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 10355-10360.
- Gorsky, L.D., Cross, S.M. and Morin, M.J. (1989) Rapid increase in the activity of DNA topoisomerase I, but not topoisomerase II, in HL-60 promyelocytic leukemia cells treated with a phorbol diester. *Cancer Commun*, **1**, 83-92.
- Gottlieb, J.A. and Luce, J.K. (1972) Treatment of malignant melanoma with camptothecin (NSC-100880). *Cancer Chemother Rep*, **56**, 103-105.
- Grollman, A.P. and Moriya, M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet*, **9**, 246-249.
- Hanawalt, P.C. (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, **21**, 8949-8956.
- Hardy, C.D., Crisona, N.J., Stone, M.D. and Cozzarelli, N.R. (2004) Disentangling DNA during replication: a tale of two strands. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **B**, 39-47.
- Hayashi, J., Takemitsu, M. and Nonaka, I. (1992) Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by introduction of mitochondrial DNA from normal human cells. *Somat Cell Mol Genet*, **18**, 123-129.
- Heck, M.M., Hittelman, W.N. and Earnshaw, W.C. (1988) Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1086-1090.
- Hino, O., Ohtake, K. and Rogler, C.E. (1989) Features of two hepatitis B virus (HBV) DNA integrations suggest mechanisms of HBV integration. *J Virol*, **63**, 2638-2643.
- Hoffmann, S., Spitkovsky, D., Radicella, J.P., Epe, B. and Wiesner, R.J. (2004) Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of Mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, **36**, 765-773.
- Hollenbach, S., Dhenaut, A., Eckert, I., Radicella, J.P. and Epe, B. (1999) Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis. *Carcinogenesis*, **20**, 1863-1868.
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R. and Harris, C.C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res*, **24**, 141-146.
- Hooper, D.C. and Wolfson, J.S. (1991) Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med*, **324**, 384-394.
- Horie, K., Tomida, A., Sugimoto, Y., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y. and Tsuruo, T. (2002) SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene*, **21**, 7913-7922.

- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **260**, 14873-14878.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G. and Liu, L.F. (1989) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res*, **49**, 5077-5082.
- Hsiang, Y.H. and Liu, L.F. (1988) Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res*, **48**, 1722-1726.
- Huppertz, B., Frank, H.G. and Kaufmann, P. (1999) The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)*, **200**, 1-18.
- Husain, I., Mohler, J.L., Seigler, H.F. and Besterman, J.M. (1994) Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res*, **54**, 539-546.
- Interthal, H., Chen, H.J., Kehl-Fie, T.E., Zotzmann, J., Leppard, J.B. and Champoux, J.J. (2005) SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme-DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity. *Embo J*.
- Interthal, H., Pouliot, J.J. and Champoux, J.J. (2001) The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12009-12014.
- Jaattela, M. (2004) Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*, **23**, 2746-2756.
- Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R. and Porter, A.G. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 9357-9360.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, **4**, 139-163.
- Jiricny, J. (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 335-346.
- Juan, C.C., Hwang, J.L., Liu, A.A., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Huebner, K., Croce, C.M., Zhang, H., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8910-8913.
- Kagawa, S., Gu, J., Honda, T., McDonnell, T.J., Swisher, S.G., Roth, J.A. and Fang, B. (2001) Deficiency of Caspase-3 in MCF7 Cells Blocks Bax-mediated Nuclear Fragmentation but not Cell Death. *Clinical Cancer Research*, **7**, 1474-1480.
- Kasid, U.N., Halligan, B., Liu, L.F., Dritschilo, A. and Smulson, M. (1989) Poly(ADP-ribose)-mediated post-translational modification of chromatin-associated human topoisomerase I. Inhibitory effects on catalytic activity. *J Biol Chem*, **264**, 18687-18692.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, **53**, 3976-3985.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, **27**, 247-254.
- King, M.P. and Attardi, G. (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol*, **264**, 304-313.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13300-13305.
- Koster, D.A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S. and Dekker, N.H. (2005) Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*, **434**, 671-674.

- Kowalska-Loth, B., Girstun, A., Derlac, R. and Staron, K. (2003) Activation of human topoisomerase I by protein kinase CK2. *Mol Biol Rep*, **30**, 107-111.
- Kretschmar, M., Meisterernst, M. and Roeder, R.G. (1993) Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11508-11512.
- Krupitza, G. and Cerutti, P. (1989) ADP-ribosylation of ADPR-transferase and topoisomerase I in intact mouse epidermal cells JB6. *Biochemistry*, **28**, 2034-2040.
- Kunze, N., Yang, G.C., Dolberg, M., Sundarp, R., Knippers, R. and Richter, A. (1991) Structure of the human type I DNA topoisomerase gene. *J Biol Chem*, **266**, 9610-9616.
- Kunze, N., Yang, G.C., Jiang, Z.Y., Hameister, H., Adolph, S., Wiedorn, K.H., Richter, A. and Knippers, R. (1989) Localization of the active type I DNA topoisomerase gene on human chromosome 20q11.2-13.1, and two pseudogenes on chromosomes 1q23-24 and 22q11.2-13.1. *Hum Genet*, **84**, 6-10.
- Labourier, E., Rossi, F., Gallouzi, I.E., Allemand, E., Divita, G. and Tazi, J. (1998) Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2955-2962.
- Lai, L.W. and Rosenstein, B.S. (1990) Induction of DNA strand breaks and DNA-protein cross-links in normal human skin fibroblasts following exposure to 254 nm UV radiation. *J Photochem Photobiol B*, **6**, 395-404.
- Lanza, A., Tornaletti, S., Rodolfo, C., Scanavini, M.C. and Pedrini, A.M. (1996) Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage. *J Biol Chem*, **271**, 6978-6986.
- Larsen, A.K. and Gobert, C. (1999) DNA topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Pathol Oncol Res*, **5**, 171-178.
- Lebedeva, N., Auffret Vander Kemp, P., Bjornsti, M.A., Lavrik, O. and Boiteux, S. (2006) Trapping of DNA topoisomerase I on nick-containing DNA in cell free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 799-809.
- Lee, M.P., Brown, S.D., Chen, A. and Hsieh, T.S. (1993) DNA topoisomerase I is essential in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6656-6660.
- Leppard, J.B. and Champoux, J.J. (2005) Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*, **114**, 75-85.
- Li, T.K. and Liu, L.F. (2001) Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 53-77.
- Liao, Z.Y., Sordet, O., Zhang, H.L., Kohlhagen, G., Antony, S., Gmeiner, W.H. and Pommier, Y. (2005) A novel polypyrimidine antitumor agent FdUMP[10] induces thymineless death with topoisomerase I-DNA complexes. *Cancer Res*, **65**, 4844-4851.
- Lin, L., Ozaki, T., Takada, Y., Kageyama, H., Nakamura, Y., Hata, A., Zhang, J.H., Simonds, W.F., Nakagawara, A. and Koseki, H. (2005) topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a coactivator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene*, **24**, 3385-3396.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.
- Liu, L.F. and Miller, K.G. (1981) Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3487-3491.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7024-7027.
- Loeb, L.A. and Preston, B.D. (1986) Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet*, **20**, 201-230.
- Lorence, A. and Nessler, C.L. (2004) Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*, **65**, 2735-2749.

- Madden, K.R., Stewart, L. and Champoux, J.J. (1995) Preferential binding of human topoisomerase I to superhelical DNA. *Embo J*, **14**, 5399-5409.
- Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M. and Vogt, P.K. (1987) Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2848-2852.
- Malanga, M. and Althaus, F.R. (2004) Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. *J Biol Chem*, **279**, 5244-5248.
- Mao, Y., Mehl, I.R. and Muller, M.T. (2002) Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1235-1240.
- Mao, Y. and Muller, M.T. (2003) Down modulation of topoisomerase I affects DNA repair efficiency. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 1115-1126.
- Mao, Y., Okada, S., Chang, L.S. and Muller, M.T. (2000a) p53 dependence of topoisomerase I recruitment in vivo. *Cancer Res*, **60**, 4538-4543.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D. and Liu, L.F. (2000b) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *PNAS*, **97**, 4046-4051.
- Marnett, L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**, 361-370.
- Mattern, M.R., Mong, S.M., Bartus, H.F., Mirabelli, C.K., Crooke, S.T. and Johnson, R.K. (1987) Relationship between the intracellular effects of camptothecin and the inhibition of DNA topoisomerase I in cultured L1210 cells. *Cancer Res*, **47**, 1793-1798.
- Maul, G.G., French, B.T., van Venrooij, W.J. and Jimenez, S.A. (1986) Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5145-5149.
- McLeod, H.L. and Keith, W.N. (1996) Variation in topoisomerase I gene copy number as a mechanism for intrinsic drug sensitivity. *Br J Cancer*, **74**, 508-512.
- Meek, D.W. (2004) The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1049-1056.
- Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J. and Reinberg, D. (1993) DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, **365**, 227-232.
- Mialon, A., Sankinen, M., Soderstrom, H., Junttila, T.T., Holmstrom, T., Koivusalo, R., Papageorgiou, A.C., Johnson, R.S., Hietanen, S., Elenius, K. and Westermarck, J. (2005) DNA topoisomerase I is a cofactor for c-Jun in the regulation of epidermal growth factor receptor expression and cancer cell proliferation. *Mol Cell Biol*, **25**, 5040-5051.
- Miao, Z.H., Rao, V.A., Agama, K., Antony, S., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (2006) 4-nitroquinoline-1-oxide induces the formation of cellular topoisomerase I-DNA cleavage complexes. *Cancer Res*, **66**, 6540-6545.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S. and Noda, T. (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4156-4161.
- Mo, Y.Y., Wang, C. and Beck, W.T. (2000) A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **275**, 41107-41113.
- Mo, Y.Y., Yu, Y., Shen, Z. and Beck, W.T. (2002) Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem*, **277**, 2958-2964.
- Mollinedo, F. and Gajate, C. (2003) Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, **8**, 413-450.
- Morham, S.G., Kluckman, K.D., Voulomanos, N. and Smithies, O. (1996) Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol Cell Biol*, **16**, 6804-6809.

- Muggia, F.M., Creaven, P.J., Hansen, H.H., Cohen, M.H. and Selawry, O.S. (1972) Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother Rep*, **56**, 515-521.
- Muller, M.T., Pfund, W.P., Mehta, V.B. and Trask, D.K. (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *Embo J*, **4**, 1237-1243.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. and Fukuyama, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **10**, 108-116.
- Nakamura, J., Walker, V.E., Upton, P.B., Chiang, S.Y., Kow, Y.W. and Swenberg, J.A. (1998) Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res*, **58**, 222-225.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-279.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, **23**, 2757-2765.
- Nitiss, J.L., Nitiss, K.C., Rose, A. and Waltman, J.L. (2001) Overexpression of type I topoisomerases sensitizes yeast cells to DNA damage. *J Biol Chem*, **276**, 26708-26714.
- Norbury, C.J. and Zhivotovsky, B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, **23**, 2797-2808.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. and Sikorska, M. (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J*, **12**, 3679-3684.
- Paz-Elizur, T., Krupsky, M., Blumenstein, S., Elinger, D., Schechtman, E. and Livneh, Z. (2003) DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 1312-1319.
- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, **18**, 2225-2231.
- Plo, I., Liao, Z.Y., Barcelo, J.M., Kohlhausen, G., Caldecott, K.W., Weinfeld, M. and Pommier, Y. (2003) Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 1087-1100.
- Pommier, Y., Kohlhausen, G., Laco, G.S., Kroth, H., Sayer, J.M. and Jerina, D.M. (2002) Different effects on human topoisomerase I by minor groove and intercalated deoxyguanosine adducts derived from two polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides at or near a normal cleavage site. *J Biol Chem*, **277**, 13666-13672.
- Pommier, Y., Kohlhausen, G., Pourquier, P., Sayer, J.M., Kroth, H. and Jerina, D.M. (2000a) Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in DNA are potent suppressors of a normal topoisomerase I cleavage site and powerful inducers of other topoisomerase I cleavages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2040-2045.
- Pommier, Y., Laco, G.S., Kohlhausen, G., Sayer, J.M., Kroth, H. and Jerina, D.M. (2000b) Position-specific trapping of topoisomerase I-DNA cleavage complexes by intercalated benzo[a]-pyrene diol epoxide adducts at the 6-amino group of adenine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10739-10744.
- Pouliot, J.J., Robertson, C.A. and Nash, H.A. (2001) Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, **6**, 677-687.
- Pourquier, P., Bjornsti, M.A. and Pommier, Y. (1998) Induction of topoisomerase I cleavage complexes by the vinyl chloride adduct 1,N6-ethenoadenine. *J Biol Chem*, **273**, 27245-27249.
- Pourquier, P., Gioffre, C., Kohlhausen, G., Urasaki, Y., Goldwasser, F., Hertel, L.W., Yu, S., Pon, R.T., Gmeiner, W.H. and Pommier, Y. (2002) Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res*, **8**, 2499-2504.
- Pourquier, P., Pilon, A.A., Kohlhausen, G., Mazumder, A., Sharma, A. and Pommier, Y. (1997a) Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J Biol Chem*, **272**, 26441-26447.

- Pourquier, P., Takebayashi, Y., Urasaki, Y., Gioffre, C., Kohlhausen, G. and Pommier, Y. (2000) Induction of topoisomerase I cleavage complexes by 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) in vitro and in ara-C-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1885-1890.
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Fertala, J., Wang, D., Park, H.J., Essigmann, J.M., Bjornsti, M.A. and Pommier, Y. (1999) Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J Biol Chem*, **274**, 8516-8523.
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Kohlhausen, G., Mazumder, A., Gupta, M., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1997b) Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J Biol Chem*, **272**, 7792-7796.
- Pourquier, P., Waltman, J.L., Urasaki, Y., Loktionova, N.A., Pegg, A.E., Nitiss, J.L. and Pommier, Y. (2001) Topoisomerase I-mediated cytotoxicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: trapping of topoisomerase I by the O6-methylguanine. *Cancer Res*, **61**, 53-58.
- Pruss, G.J. and Drlica, K. (1986) Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8952-8956.
- Puck, T.T., Marcus, P.I. and Cieciura, S.J. (1956) Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med*, **103**, 273-283.
- Radford, I.R. (2002) Model for the initiation of ionizing radiation-induced apoptosis in lymphoid cells by complex DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol*, **78**, 467-474.
- Raha, S. and Robinson, B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, **25**, 502-508.
- Rallabhandi, P., Hashimoto, K., Mo, Y.Y., Beck, W.T., Moitra, P.K. and D'Arpa, P. (2002) Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem*, **277**, 40020-40026.
- Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J. and Hol, W.G. (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, **279**, 1504-1513.
- Rockstroh, A., Kleinert, A., Kramer, M., Grosse, F. and S  , K. (2006) Cellular stress triggers the human topoisomerase I damage response independently of DNA damage in a p53 controlled manner. *Oncogene*, epub ahead of print.
- Rosenstein, B.S. (1988) The induction of DNA strand breaks in normal human skin fibroblasts exposed to solar ultraviolet radiation. *Radiat Res*, **116**, 313-319.
- Rosenstein, B.S., Lai, L.W., Ducore, J.M. and Rosenstein, R.B. (1989) DNA-protein crosslinking in normal and solar UV-sensitive ICR 2A frog cell lines exposed to solar UV-radiation. *Mutat Res*, **217**, 219-226.
- Rosenstein, B.S., Subramanian, D. and Muller, M.T. (1997) The involvement of topoisomerase I in the induction of DNA-protein crosslinks and DNA single-strand breaks in cells of ultraviolet-irradiated human and frog cell lines. *Radiat Res*, **148**, 575-579.
- Rosenstein, B.S. and Vaslet, C.A. (1995) Molecular cloning of the human gene SUVCC3 associated with the formation of DNA-protein crosslinks following exposure to solar UV radiation. *Somat Cell Mol Genet*, **21**, 255-263.
- Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J.F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C. and Tazi, J. (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature*, **381**, 80-82.
- Rossi, F., Labourier, E., Gallouzi, I.E., Derancourt, J., Allemand, E., Divita, G. and Tazi, J. (1998) The C-terminal domain but not the tyrosine 723 of human DNA topoisomerase I active site contributes to kinase activity. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2963-2970.
- Sablina, A.A., Chumakov, P.M., Levine, A.J. and Kopnin, B.P. (2001) p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. *Oncogene*, **20**, 899-909.



- Sablina, A.A., Ilyinskaya, G.V., Rubtsova, S.N., Agapova, L.S., Chumakov, P.M. and Kopnin, B.P. (1998) Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. *J Cell Sci*, **111** ( Pt 7), 977-984.
- Samejima, K., Svingen, P.A., Basi, G.S., Kottke, T., Mesner, P.W., Jr., Stewart, L., Durrieu, F., Poirier, G.G., Alnemri, E.S., Champoux, J.J., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1999) Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 4335-4340.
- Samuels, D.S. and Shimizu, N. (1992) DNA topoisomerase I phosphorylation in murine fibroblasts treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and in vitro by protein kinase. *J Biol Chem*, **267**, 11156-11162.
- Samuels, D.S., Shimizu, Y. and Shimizu, N. (1989) Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I. *FEBS Lett*, **259**, 57-60.
- Sancar, A. (1996) DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*, **65**, 43-81.
- Sari, L. and Andricioaei, I. (2005) Rotation of DNA around intact strand in human topoisomerase I implies distinct mechanisms for positive and negative supercoil relaxation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6621-6634.
- Schärer, O.D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 2946-2974.
- Schärer, O.D. and Jiricny, J. (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays*, **23**, 270-281.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.
- Shah, G.M., Shah, R.G. and Poirier, G.G. (1996) Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **229**, 838-844.
- Shero, J.H., Bordwell, B., Rothfield, N.F. and Earnshaw, W.C. (1986) High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science*, **231**, 737-740.
- Sherratt, D.J. and Wigley, D.B. (1998) Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell*, **93**, 149-152.
- Sherwood, S.W., Sheridan, J.P. and Schimke, R.T. (1994) Induction of apoptosis by the anti-tubulin drug colcemid: relationship of mitotic checkpoint control to the induction of apoptosis in HeLa S3 cells. *Exp Cell Res*, **215**, 373-379.
- Shykind, B.M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J.J. and Sharp, P.A. (1997) Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev*, **11**, 397-407.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Boulares, A.H., Hickey, R.J., Malkas, L.H., Coll, J.M. and Smulson, M.E. (1998) Regulation of the expression or recruitment of components of the DNA synthesome by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry*, **37**, 9363-9370.
- Smith, H.M. and Grosovsky, A.J. (1999) PolyADP-ribose-mediated regulation of p53 complexed with topoisomerase I following ionizing radiation. *Carcinogenesis*, **20**, 1439-1443.
- Søe, K., Dianov, G., Nasheuer, H.-P., Bohr, V.A., Große, F. and Stevnsner, T. (2001) A human topoisomerase I cleavage complex is recognized by an additional human topoisomerase I molecule in vitro. *Nucleic Acids Research*, **29**, 3195-3203.
- Søe, K. and Grosse, F. (2003) p53 stimulates human topoisomerase I activity by modulating its DNA binding. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6585-6592.
- Søe, K., Hartmann, H., Schlott, B., Stevnsner, T. and Große, F. (2002) The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex in vitro. *Oncogene*, **12**, 6614-6623.
- Søe, K., Hartung, S. and Grosse, F. (2006) Human topoisomerase I forms double cleavage complexes on natural DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **349**, 178-185.

- Søe, K., Rockstroh, A. and Grosse, F. (2005) Role of Human Topoisomerase I in DNA Repair and Apoptosis. *Genome Dynamics & Stability, Springer-Verlag München Heidelberg, (in press)*.
- Søe, K., Rockstroh, A., Schache, P. and Grosse, F. (2004) The human topoisomerase I damage response plays a role in apoptosis. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 387-393.
- Solovyan, V.T., Bezvenyuk, Z.A., Salminen, A., Austin, C.A. and Courtney, M.J. (2002) The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 21458-21467.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Plo, I., Pourquier, P., Urasaki, Y., Yoshida, A., Antony, S., Kohlhagen, G., Solary, E., Saparbaev, M., Laval, J. and Pommier, Y. (2004a) Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *J Biol Chem*, **279**, 50499-50504.
- Sordet, O., Khan, Q.A. and Pommier, Y. (2004b) Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by oxygen radicals and mitochondrial dysfunction. *Cell Cycle*, **3**, 1095-1097.
- Sordet, O., Liao, Z., Liu, H., Antony, S., Stevens, E.V., Kohlhagen, G., Fu, H. and Pommier, Y. (2004c) Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 33968-33975.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1416.
- Stein, G.H. (1979) T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol*, **99**, 43-54.
- Stephan, H., Große, F. and Søe, K. (2002) Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by p53-stimulated recombination-like reaction in vitro. *Nucleic Acids Research*, **30**, 1-8.
- Stevnsner, T., Mortensen, U.H., Westergaard, O. and Bonven, B.J. (1989) Interactions between eukaryotic DNA topoisomerase I and a specific binding sequence. *J Biol Chem*, **264**, 10110-10113.
- Stewart, L., Ireton, G.C. and Champoux, J.J. (1996a) The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem*, **271**, 7602-7608.
- Stewart, L., Ireton, G.C. and Champoux, J.J. (1999) A functional linker in human topoisomerase I is required for maximum sensitivity to camptothecin in a DNA relaxation assay. *J Biol Chem*, **274**, 32950-32960.
- Stewart, L., Ireton, G.C., Parker, L.H., Madden, K.R. and Champoux, J.J. (1996b) Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J Biol Chem*, **271**, 7593-7601.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G. and Champoux, J.J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, **279**, 1534-1541.
- Stivers, J.T., Harris, T.K. and Mildvan, A.S. (1997) Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry*, **36**, 5212-5222.
- Stojic, L., Brun, R. and Jiricny, J. (2004) Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1091-1101.
- Stopper, H., Eckert, I., Schiffmann, D., Spencer, D.L. and Caspary, W.J. (1994) Is micronucleus induction by aneugens an early event leading to mutagenesis? *Mutagenesis*, **9**, 411-416.
- Straub, T., Grue, P., Uhse, A., Lisby, M., Knudsen, B.R., Tange, T.O., Westergaard, O. and Boege, F. (1998) The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction. *J Biol Chem*, **273**, 26261-26264.
- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L. and Pommier, Y. (2000) Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol*, **20**, 3977-3987.
- Subramanian, D., Furbee, C.S. and Muller, M.T. (2001) ICE bioassay. Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA. *Methods Mol Biol*, **95**, 137-147.

- Subramanian, D., Kraut, E., Staubus, A., Young, D.C. and Muller, M.T. (1995) Analysis of topoisomerase I/DNA complexes in patients administered topotecan. *Cancer Res*, **55**, 2097-2103.
- Subramanian, D., Rosenstein, B.S. and Muller, M.T. (1998) Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer Res*, **58**, 976-984.
- Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B.J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J.K., Martinson, J.J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K. and Yokota, J. (1999) hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 669-674.
- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.-C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, J.W.C. and Kroemer, G. (2000) Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J. Exp. Med.*, **192**, 571-580.
- Svejstrup, J.Q., Christiansen, K., Andersen, A.H., Lund, K. and Westergaard, O. (1990) Minimal DNA duplex requirements for topoisomerase I-mediated cleavage in vitro. *J Biol Chem*, **265**, 12529-12535.
- Takashima, H., Boerkoel, C.F., John, J., Saifi, G.M., Salih, M.A., Armstrong, D., Mao, Y., Quijcho, F.A., Roa, B.B., Nakagawa, M., Stockton, D.W. and Lupski, J.R. (2002) Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet*, **32**, 267-272.
- Tang, D. and Kidd, V.J. (1998) Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 28549-28552.
- Tse-Dinh, Y.C., Wong, T.W. and Goldberg, A.R. (1984) Virus- and cell-encoded tyrosine protein kinases inactivate DNA topoisomerases in vitro. *Nature*, **312**, 785-786.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, **2**, 196-206.
- Van Meir, E.G., Kikuchi, T., Tada, M., Li, H., Diserens, A.C., Wojcik, B.E., Huang, H.J., Friedmann, T., de Tribolet, N. and Cavenee, W.K. (1994) Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, **54**, 649-652.
- Vance, J.R. and Wilson, T.E. (2002) Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13669-13674.
- Virchow, R. and Chandler, A.B. (1859) Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. *New York: Dover Publications*.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, **10**, 45-65.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cooke, C.E., Palmer, K.H. and McPhail, A.T. (1966) Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3888-3890.
- Wang, J.C. (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol*, **55**, 523-533.
- Wang, J.C. (1982) DNA topoisomerases. *Sci Am*, **247**, 94-97, 100-109.
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, **65**, 635-692.
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, **15**, 2922-2933.
- Weger, S., Hammer, E. and Engstler, M. (2003) The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation. *Exp Cell Res*, **290**, 13-27.
- Weger, S., Hammer, E. and Heilbronn, R. (2005) Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*, **579**, 5007-5012.

- Wesierska-Gadek, J., Schloffer, D., Kotala, V. and Horky, M. (2002) Escape of p53 protein from E6-mediated degradation in HeLa cells after cisplatin therapy. *Int J Cancer*, **101**, 128-136.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999) Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat Res*, **435**, 89-101.
- Wilson, D.M., 3rd and Thompson, L.H. (1997) Life without DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12754-12757.
- Wolf, B.B., Schuler, M., Echeverri, F. and Green, D.R. (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem*, **274**, 30651-30656.
- Woo, M.H., Losasso, C., Guo, H., Pattarello, L., Benedetti, P. and Bjornsti, M.A. (2003) Locking the DNA topoisomerase I protein clamp inhibits DNA rotation and induces cell lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13767-13772.
- Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, **53**, 433-440.
- Wu, J. and Liu, L.F. (1997) Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4181-4186.
- Wu, Y., Hickey, R., Lawlor, K., Wills, P., Yu, F., Ozer, H., Starr, R., Quan, J.Y., Lee, M. and Malkas, L. (1994) A 17S multiprotein form of murine cell DNA polymerase mediates polyomavirus DNA replication in vitro. *J Cell Biochem*, **54**, 32-46.
- Yang, M., Hsu, C.T., Ting, C.Y., Liu, L.F. and Hwang, J. (2006) Assembly of a polymeric chain of sumO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem*.
- Yang, S.W., Burgin, A.B., Jr., Huizenga, B.N., Robertson, C.A., Yao, K.C. and Nash, H.A. (1996) A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11534-11539.
- Yeh, Y.C., Chang, D.Y., Masin, J. and Lu, A.L. (1991) Two nicking enzyme systems specific for mismatch-containing DNA in nuclear extracts from human cells. *J Biol Chem*, **266**, 6480-6484.
- Yeh, Y.C., Liu, H.F., Ellis, C.A. and Lu, A.L. (1994) Mammalian topoisomerase I has base mismatch nicking activity. *J Biol Chem*, **269**, 15498-15504.
- Yu, D., Khan, E., Khaleque, M.A., Lee, J., Laco, G., Kohlhagen, G., Kharbanda, S., Cheng, Y.C., Pommier, Y. and Bharti, A. (2004) Phosphorylation of DNA topoisomerase I by the c-Abl tyrosine kinase confers camptothecin sensitivity. *J Biol Chem*, **279**, 51851-51861.
- Yung, T.M., Sato, S. and Satoh, M.S. (2004) Poly(ADP-ribosyl)ation as a DNA Damage-induced Post-translational Modification Regulating Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-Topoisomerase I Interaction. *J Biol Chem*, **279**, 39686-39696.
- Zamai, L., Falcieri, E., Zauli, G., Cataldi, A. and Vitale, M. (1993) Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry*, **14**, 891-897.
- Zechiedrich, E.L. and Osheroff, N. (1990) Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *Embo J*, **9**, 4555-4562.
- Zhu, J. and Schiestl, R.H. (2004) Human topoisomerase I mediates illegitimate recombination leading to DNA insertion into the ribosomal DNA locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, **271**, 347-358.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
8oxoG	7,8-Dihydro-8-oxo-Guanin
A	Absorption (Extinktion)
AIF	Apoptose-Induzierender-Faktor
AP	apurinisch
APE-1	apurinische Endonuklease 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATE	all-type nicking enzyme
ATM	Ataxia-Telangiektasia-Mutiert
BER	base excision repair / Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
c	centi
c-Abl	protein corresponding to the human cellular homologue ( <i>c-abl</i> ) of the transforming sequence of Abelson murine leukaemia virus
CAD/DFF40	Caspase aktivierte DNase / DNA-Fragmentierungsfaktor 40
Chk1	Checkpoint Kinase 1/2
c-Jun	protein corresponding to the cell derived oncogene of Avian Sarcoma Virus 17, abbrev. of Japanese <i>ju-nana</i> = the number 17 (Maki et al., 1987)
CPT	Camptothecin
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double-stranded (doppelsträngig)
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetal-calf-serum (fetales Kälberserum)
FEN-1	Flap-Endonuklease 1
g	Gramm
G1/2-Phase	Gap1/2-Phase des Zellzyklus
GADD45	protein corresponding to the growth arrest and DNA damage gene 45
GGR	global genome repair / globale Genomreparatur
h	Stunde(n)
HeLa S3	Cervixkarzinomzelllinie, nach Henrietta Lacks benannt
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HIF1	hypoxia inducible factor / durch Hypoxie induzierbarer Faktor
HR	homologe Rekombination
HRP	horseradish-peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
hTopoI	humane Topoisomerase I
ICAD/DFF45	Inhibitor von CAD / DNA-Fragmentierungsfaktor 45
ICT	<i>in vivo</i> complex of topoisomerase
k	kilo
l	Liter
M	molare Masse (in g/mol)
M (Einheit)	Molar (entspricht mol/l)
m	milli
mA	Milliamperé
Mbp	Megabasenpaar

MCF7	mamma carcinoma fibroblasts / Mammakarzinomzelllinie
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MMR	mismatch repair / Fehlpaarungsreparatur
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MTH	MutT Homologes
MYH	MutY Homologes
n	nano
NAC	N-Acetyl-Cystein
NER	nucleotide excision repair / Nukleotidexzisions-Reparatur
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NHEJ	non-homologous end joining / nicht-homologe Rekombination
NK	Negativkontrolle
nt	Nucleotid
OGG1	8oxoG-Glykosylase 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP1	Poly(ADP-ribose)Polymerase 1
PBS	phosphate-buffered-saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
PSF	Pyrimidintrakt-Bindeprotein assoziierter Splicingfaktor
qm	Quadratmeter
ROS	reactive oxygen species / reaktive Sauerstoffderivate
RPA	Replikationsprotein A
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SCAN1	spinozerebellare Ataxie mit axonaler Neuropathie-1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Splicing Faktor
S-Phase	Synthese Phase des Zellzyklus, Replikationsphase
ss	single-stranded (einzelsträngig)
SUMO	small ubiquitin-like modifiers
SUVCC3	solar UV cross-complementing gene number 3
T98G	Glioblastomzelllinie
TCR	transcription coupled repair / Transkriptions-gekoppelte Reparatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
TIRR	Topoisomerase-induzierte Rekombinations-ähnliche Reparatur
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBC9	Ubiquitin-like protein SUMO-1 conjugating enzyme 9
UV	ultraviolett(e Strahlung)
v/v	Volumenprozent
WB	Western-Blot
xg	x fache Erdbeschleunigung (981 cm/s <sup>2</sup> )
XPA	Xeroderma Pigmentosum Faktor A / Adapterprotein
XPD	Xeroderma Pigmentosum Faktor D / Helikase
XRCC1	X-ray cross complementing factor 1



Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand am **Leibniz Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut in Jena**, mit freundlicher Genehmigung von **Prof. Frank Große**, dem ich des Weiteren für die Übernahme der Position des betreuenden Hochschullehrers danken möchte. Die fachlichen Diskussionen waren stets hilfreich Ergebnisse zu verbessern und für kritische Fragen gerüstet zu sein.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Dr. Kent Søe** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die fachliche Beratung im Rahmen dieser Arbeit. Vielen Dank für die ausdauernde Motivation, den Enthusiasmus und den unerschütterlichen Glauben in das Gelingen unseres Projektes. Bedanken möchte ich mich auch für die Diskussionsbereitschaft sowie für die Freiheit selbständig arbeiten und auch eigene Ideen umsetzen zu können.

Danken möchte ich weiterhin unseren **Kooperationspartnern** Prof. Bernd Epe aus Mainz (MEF Zelllinien, OGG1 Vektoren, Methode zur Einführung oxidativer DNA-Schäden), Dr. Jan Marxsen aus Lübeck (Hypoxie-Experimente), Dr. Tinna Stevnsner aus Aarhus, Dänemark (Methode zur Einführung oxidativer DNA-Schäden) und Prof. Lene Rasmussen aus Roskilde, Dänemark (HeLa  $\rho 0$  Zelllinie) für die Unterstützung meiner Projekte. Danke ebenfalls an Norma und Dr. Schlott für die massenspektrometrische Analyse der MEF Zellen.

Ein herzliches Dankeschön an alle **Mitarbeiter der Biochemie** für die freundliche Aufnahme in der Abteilung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dies gilt insbesondere für alle ehemaligen Mitstreiter in der hTopoI-Arbeitsgruppe, mit denen die Leiden des ICT Assays geteilt werden konnten. Ein spezieller Dank gilt dabei Marcel, der mein Forschungsprojekt im Rahmen seines Praktikumssemesters tatkräftig unterstützte. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei Annerose für die unersetzliche Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen des Laboralltages bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei **Sibyll**, die mit mir gemeinsam alle Höhen und Tiefen seit Beginn unseres Studiums durchlebte. Und da geteiltes Leid bekanntlich halbes Leid ist, vielen Dank für das geduldige Zuhören und das Verständnis bei all den unendlichen Labor- und Doktorandenproblemen. Vielen Dank auch für das Diskutieren vieler „dummer Fragen“ und die guten Ratschläge. Insofern hoffe ich, dass wir uns auch in Zukunft nicht ganz aus den Augen verlieren werden.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an **meine Eltern**, für die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen, die aufmunternden Worte und den nötigen Rückhalt in schweren Zeiten. Danke auch an meinen Optimisten **Jörg**, für den unbeirrbaren Kampf gegen meine schlechten Launen, den Beistand bei allen seelischen Krisen während der Anfertigung dieser Arbeit und natürlich vor allem für die so notwendige Ablenkung vom chaotischen Leben in der Wissenschaft.

---

Name	Anja Rockstroh
Geburtsdatum	09. Juli 1978
Geburtsort	Sonneberg / Thüringen, Deutschland
Ausbildung	
2003 – 2006	Doktorand am <b>Leibniz Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI-Jena)</b> Abteilung Biochemie, Beutenbergstrasse 11, 07745 Jena <a href="http://www.fli-leibniz.de/groups/grosse.php">http://www.fli-leibniz.de/groups/grosse.php</a>  <i>Titel der Dissertationsarbeit:</i> <b>Humane Topoisomerase I und genotoxischer Stress</b> Betreuung durch Prof. Frank Große und Dr. Kent Søre
2002	Abschluss des <b>Biochemie-Studiums</b> mit dem <b>Diplom</b> Prüfungsfächer: Biochemie, Molekularbiologie, Zellbiologie Molekulare Toxikologie
2001 – 2002	Diplomarbeit am <b>Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. (IMB)</b> Abteilung Biochemie, Beutenbergstrasse 11, 07745 Jena  <i>Titel der Diplomarbeit:</i> <b>Charakterisierung der humanen DNA-Polymerase-<math>\delta</math></b> Betreuung durch Prof. Frank Große und Dr. Heinz-Peter Nasheuer
1997 – 2002	Studium der <b>Biochemie / Molekularbiologie</b> an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
1997	Abitur am 1. Staatlichen Gymnasium Sonneberg

#### Publikationen

- Anja Rockstroh, Astrid Kleinert, Marcel Kramer, Frank Große & Kent Søre  
**„Cellular stress triggers the human topoisomerase I damage response independently of DNA damage in a p53 controlled manner“**  
*Oncogene*, 2007 Jan 4; 26(1):123-31; Epub 2006 Jun 26 *PMID: 16799632*
- Kent Søre, Anja Rockstroh, Frank Große  
**„Role of Human Topoisomerase I in DNA Repair and Apoptosis“**  
*Genome Integrity; Facets and Perspectives; Series: Genome Dynamics & Stability Vol. 1;*  
*Lankenau, D.H. (Ed.) 2006, Due: November 7, 2006 - Springer-publishing Berlin / Heidelberg,*  
*Published online: 20<sup>th</sup> October 2005* *ISBN: 3-540-37528-7*
- Kent Søre, Anja Rockstroh, Peter Schache & Frank Große  
**„The human topoisomerase I damage response plays a role in apoptosis“**  
*DNA Repair (Amst)*. 2004 Apr 1; 3(4):387-93 *PMID: 15010314*
-